

Aus dem Institut für Anatomie
der Universitätsmedizin Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Wree

**Die Proteomanalyse von Bulbus olfactorius,
Cerebellum und Cortex cerebri der juvenilen, adulten
und gealterten Ratte – Eine ontogenetische Studie**

Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Michael Wille, geb. am 23.11.1982 in Lingen (Ems)
aus Rostock

Rostock, den 22.02.2016

Dekan: Prof. Dr. Klaus Neymeyr

Gutachter:

1. Gutachter: Prof. Dr. med Oliver Schmitt

Universitätsmedizin Rostock

Institut für Anatomie

Gertrudenstraße 9

18057 Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. Guido Dehnhardt

Universität Rostock

Institut für Biowissenschaften

Sensorische und kognitive Ökologie

Albert-Einstein-Str. 3

18059 Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Rehkämper

Universitätsklinikum Düsseldorf

C. und O. Vogt-Institut für Hirnforschung

Universitätsstraße 1

40225 Düsseldorf

Datum der Einreichung: 24.02.2016

Datum der Verteidigung: 08.07.2016

Für meine Eltern

Teile der Arbeit sind veröffentlicht worden in:

1. **Wille M**, Schümann A, Kreutzer M, Glocker MO, Wree A, Mutzbauer G, Schmitt O (2015) The proteome profiles of the olfactory bulb of juvenile, adult and aged rats - an ontogenetic study. *Proteome Sci.* 13: 8.
2. **Wille M**, Schümann A, Kreutzer M, Glocker MO, Wree A, Mutzbauer G, Schmitt O (2015) The proteome profiles of the cerebellum of juvenile, adult and aged rats - an ontogenetic study. *Int J Mol Sci.* 16: 21454-85.

Erklärung

Die Dissertation wurde bisher weder vorher noch gleichzeitig oder in ähnlicher Form bei einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe, bis auf die Personen, denen gedankt wird, verfasst und andere als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen nicht benutzt habe. Die in den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Ich erkläre, dass ich noch kein Promotionsverfahren an einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Rostock, den 22.02.2016

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Gehirnentwicklung im prä- und postnatalen Stadium der Ratte	1
1.1.1 Ontogenese des Bulbus olfactorius	3
1.1.2 Ontogenese des Cerebellums.....	6
1.1.3 Ontogenese des Cortex cerebri	9
1.2 Proteomik	10
1.2.1 Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese (PAGE).....	11
1.2.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-PAGE).....	12
1.2.3 Proteinidentifikation mit Hilfe der Massenspektrometrie	12
1.2.4 Neuroproteomik	13
1.2.4.1 Neuroproteomik mit dem Schwerpunkt zur Analyse der Expression von Proteinen	13
1.2.4.2 Funktionelle Neuroproteomik.....	14
1.2.4.3 Klinische Neuroproteomik.....	14
1.2.4.4 Neuroproteomik mit bioinformatischem Hintergrund.....	14
1.3 ZNS-Entwicklung und Veränderungen des Mikromilieus	15
1.4 Fragestellung	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Versuchstiere	17
2.2 Perfusion und Präparation.....	17
2.3 Homogenisierung	18
2.4 Proteinbestimmung nach Bradford.....	19
2.5 Zweidimensionale Polacrylamid Gelelektrophorese.....	19
2.5.1 Rehydrierung	20
2.5.2 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung	21
2.5.3 Zweite Dimension: Polyacrylamid Gelelektrophorese	21
2.6 Fixierung und Färbung der Gele	22

2.7 Analyse der Einzelgele.....	23
2.7.1 Digitalisierung	23
2.7.2 Digitale Gelanalyse	24
2.7.3 Bestimmung der Proteine/Spots für die weitere Analyse	25
2.7.4 Bestimmung differentiell exprimierter und abundant ausgebildeter Proteine	25
2.7.5 Statistik	25
2.8 Spotidentifikation.....	26
2.8.1 Spot Picking.....	26
2.8.2 Tryptische in-Gel Verdauung	26
2.8.3 Massenspektrometrische Analyse	27
2.9 Western Blot Analyse.....	28
2.9.1 Durchführung der SDS-PAGE.....	28
2.9.2 ECL-Western Blot (Tank Blotting).....	28
2.9.3 Immunochemischer Nachweis von Proteinen mittels ECL.....	29
3. Ergebnisse	31
3.1 Ergebnisse der 2D-PAGE nach Fixierung und Färbung.....	31
3.2 Ergebnisse der Spotzuordnung.....	32
3.3 Ergebnisse der Spotidentifikation.....	33
3.4 Ergebnisse der Proteinidentifikation.....	34
3.4.1 Ergebnisse der Proteinidentifikation im oB	34
3.4.2 Ergebnisse der Proteinidentifikation im Ce	44
3.4.3 Ergebnisse der Proteinidentifikation im Co	51
3.5 Ergebnisse der Western Blot Validierung.....	59
4. Diskussion	61
4.1 Vorkommen der gewählten Proteinklassen innerhalb der unterschiedlichen Regionen	61
4.2 Analyse der differentiell exprimierten Proteine.....	61

4.2.1 Proteine des Kohlenhydratmetabolismus.....	62
4.2.2 Proteine des Aminosäuremetabolismus.....	66
4.2.3 Proteine des Fettmetabolismus.....	67
4.2.4 Proteine des Energiemetabolismus	69
4.2.5 Proteine mit degradierender Wirkungsweise	71
4.2.6 Proteine mit antioxidativer Wirkungsweise.....	73
4.2.7 Proteine des Transmittermetabolismus.....	75
4.2.8 Proteine der Signaltransduktion	75
4.2.9 Proteine der Proteinbiosynthese	77
4.2.10 Regulationsproteine	78
4.2.11 Chaperone	80
4.2.12 Strukturproteine	82
4.2.13 Transportproteine.....	87
5. Ausblick	91
6. Beantwortung der Fragestellung	93
7. Anhang	I
7.1 Literaturverzeichnis	I
7.2 Lösungen	XIX
7.2.1 Gewebepräparation	XIX
7.2.2 Homogenisierung.....	XIX
7.2.3 Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)	XIX
7.2.4 SDS PAGE (2. Dimension)	XX
7.2.5 Fixierung und Färbung.....	XX
7.2.6 Massenspektrometrische Analyse	XXI
7.2.7 Western Blot Analyse.....	XXI
7.3 Verwendete Antikörper für die Western Blot Analyse.....	XXII
7.4 Chemikalien	XXIII
7.5 Geräte/Materialien.....	XXV

7.5.1 Homogenisierung.....	XXV
7.5.2 Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)	XXVI
7.5.3 SDS PAGE (2. Dimension)	XXVI
7.5.4 Digitalisierung	XXVI
7.5.5 Massenspektrometrische Analyse	XXVI
7.5.6 Western Blot Analyse.....	XXVII
7.6 Ergebnistabellen aller gepickten Spots/Proteine	XXVIII
7.6.1 Ergebnistabelle des Bulbus olfactorius	XXVIII
7.6.2 Ergebnistabelle des Cerebellums	XXXVI
7.6.3 Ergebnistabelle des Cortex cerebri	XLIV
7.6.4 Ergebnistabelle des Cerebellums mit Bezug auf die Ergebnisse der „multi condition coverage method“ und des „Mann-Whitney U^t -Tests	L
7.7 Kennzeichnung der differentiell regulierten Proteine	LV
7.7.1 Innerhalb des Referenz-Gels des Bulbus olfactorius	LV
7.7.2 Innerhalb des Referenz-Gels des Cerebellums	LVII
7.7.3 Innerhalb des Referenz-Gels des Cortex cerebri	LXI
Zusammenfassung	LXV
Danksagung	LXVII

Abbildungsverzeichnis

- S. 5 Abbildung 1: Übersicht des Rattenhirns mit Bezug auf den oB.
- S. 7 Abbildung 2: Übersicht des Rattenhirns mit Bezug auf das Ce.
- S. 8 Abbildung 3: Schematische Übersicht der Hauptzeitpunkte der postnatalen Entwicklung des cerebellaren Kortex.
- S. 11 Abbildung 4: Übersicht der methodischen Verbesserungen innerhalb der (Neuro-) Proteomik.
- S. 23 Abbildung 5: Gelfärbung am Beispiel der Referenz-Gele des oB für die Zeitpunkte P7, P90 und P637.
- S. 24 Abbildung 6: Übersicht zur manuellen Spot Segmentierung.
- S. 29 Abbildung 7: Zusammensetzung der Blotkassette.
- S. 31 Abbildung 8: Referenz-Gele der untersuchten Regionen am Beispiel des Ce zu den unterschiedlichen Zeitpunkten P7 (a) , P90 (b) und P637 (c) nach Fixierung und Färbung.
- S. 35 Abbildung 9: Relative Häufigkeit der differentiell exprimierten Proteine innerhalb des oB [P7 vs P90].
- S. 36 Abbildung 10: Anzahl an differentiell exprimierten Proteinen der unterschiedlichen Proteinkategorien innerhalb des oB [P7 vs P90] (20 = 100%).
- S. 37 Abbildung 11: Relative Häufigkeit der differentiell exprimierten Proteine innerhalb des oB [P637 vs P90].
- S. 38 Abbildung 12: Anzahl an differentiell exprimierten Proteinen der unterschiedlichen Proteinkategorien innerhalb des oB [P637 vs P90] (20 = 100%).
- S. 44 Abbildung 13: Relative Häufigkeit der differentiell exprimierten Proteine innerhalb des Ce [P7 vs P90].
- S. 45 Abbildung 14: Anzahl an differentiell exprimierten Proteinen der unterschiedlichen Proteinkategorien innerhalb des Ce [P7 vs P90] (20 = 100%).
- S. 46 Abbildung 15: Relative Häufigkeit der differentiell exprimierten Proteine innerhalb des Ce [P637 vs P90].
- S. 47 Abbildung 16: Anzahl an differentiell exprimierten Proteinen der unterschiedlichen Proteinkategorien innerhalb des Ce [P637 vs P90] (20 = 100%).
- S. 52 Abbildung 17: Relative Häufigkeit der differentiell exprimierten Proteine innerhalb des Co [P7 vs P90].
- S. 52 Abbildung 18: Anzahl an differentiell exprimierten Proteinen der unterschiedlichen Proteinkategorien innerhalb des Co [P7 vs P90] (20 = 100%).
- S. 54 Abbildung 19: Relative Häufigkeit der differentiell exprimierten Proteine innerhalb des Co [P637 vs P90].
- S. 55 Abbildung 20: Anzahl an differentiell exprimierten Proteinen der unterschiedlichen Proteinkategorien innerhalb des Co [P637 vs P90] (20 = 100%).
- S. 59 Abbildung 21: Linke Seite: Übersicht eines Kontrollgels (oB, P90) mit Markierungen (Rechtecke a-d), die Einzelspots differentiell regulierter Proteine

eingrenzen. Rechte Seite: Vergrößerung der markierten Regionen (a-d) für jede Entwicklungsstufe (P7, P90, P637).

- S. 60 Abbildung 22: Validierung einzelner differentiell exprimierter Proteine innerhalb des oB mit Hilfe des Western Blot Verfahrens (Mitogen-activated protein kinase 1, 2 (Erk1,2), Phospho Mitogen-activated protein kinase 1, 2 (Erk1,2P), Neurofilament Low (NF-L), Neurofilament Medium (NF-M) and Gamma Enolase (γ Enolase)) zwischen den unterschiedlichen Alterstufen (P7, P90, P637).

Tabellenverzeichnis

- S. 32 Tabelle 1: Übersicht der differentiellen Spotanzahl pro Einzelgel (Referenz-Gel und Template-Gele) zu den Zeitpunkten P7, P90, P637 im oB.
- S. 32 Tabelle 2: Übersicht der differentiellen Spotanzahl pro Einzelgel (Referenz-Gel und Template-Gele) zu den Zeitpunkten P7, P90, P637 im Ce.
- S. 32 Tabelle 3: Übersicht der differentiellen Spotanzahl pro Einzelgel (Referenz-Gel und Template-Gele) zu den Zeitpunkten P7, P90, P637 im Co.
- S. 33 Tabelle 4: Übersicht der Spotanzahl pro Einzelgel pro Region zu den Zeitpunkten P7, P90 und P637 für die Berechnung des SVQ.
- S. 33 Tabelle 5: Gesamtmenge an analysierten Proteinen pro Region.
- S. 34 Tabelle 6: Übersicht der differentiellen Expression der Proteine des oB in P7 und P637 im Vergleich zu P90.
- S. 39 Tabelle 7: Ergebnistabelle der identifizierten Proteine durch Peptide Mass Fingerprinting der Coomassie gefärbten Gele des oB.
- S. 44 Tabelle 8: Übersicht der differentiellen Expression der Proteine des Ce in P7 und P637 im Vergleich zu P90.
- S. 48 Tabelle 9: Ergebnistabelle der identifizierten Proteine durch Peptide Mass Fingerprinting der Coomassie gefärbten Gele des Ce.
- S. 51 Tabelle 10: Übersicht der differentiellen Expression der Proteine des Co in P7 und P637 im Vergleich zu P90.
- S. 56 Tabelle 11: Ergebnistabelle der identifizierten Proteine durch Peptide Mass Fingerprinting der Coomassie gefärbten Gele des Co.

Abkürzungsverzeichnis

2D-PAGE	zweidimensionale Gelelektrophorese
A	Axon
AoB	akzessorischer Bulbus olfactorius
BSA	Bovine serum albumin
CBB	Coomassie blue
Ce	Cerebellum
Co	Cortex cerebri
cp	Chaperone
Cpm	Zytoplasma
Cpg	zytoplasmatische Granula
Cr	Chromosom
Csk	Zytoskelett
Cpv	zytoplasmatischer Vesikel
Cts	Zentrosom
Eds	Endosom
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektronenspray-Ionisation
Exr	extrazelluläre Region
Gc	Wachstumskegel
Gj	Gap junction
Golgi	Golgi-Apparat
HoB	Haupt Bulbus olfactorius
hGc	heterotrimerischer G-protein Rezeptorkomplex
HRP	Meerrettichperoxidase
IEF	isoelektrische Fokussierung
La	Lipid-Anker
LC	Flüssig-Chromatographie
Lyso	Lysosom
M	Membran
MALDI	Matrix assisted laser desorption ionization
MALDI-TOF	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation mit Flugzeitanalysator
Mel	Melanosom
Micro	Microsom
Mim	innere mitochondriale Membran
MimS	mitochondrialer Intermembranraum
Mito	Mitochondrium
Mm	mitochondriale Membran
Mmt	mitochondriale Matrix
Mom	äußere mitochondriale Membran
MT	Microtubuli
Nc	Nucleus
Nf	Neurofilament
Nm	Nucleus matrix
Np	Nucleoplasma
oB	Bulbus olfactorius
P	Proteasom
PAGE	Polyacrylamide-Gel-Elektrophorese
pa	Proteine mit antioxidantischer Wirkungsweise
paam	Proteine des Aminosäuremetabolismus

pb	Proteine der Biosynthese
pcm	Proteine des Kohlenhydratmetabolismus
pd	Degratorische Proteine
Per	Peroxisom
pem	Proteine des Energiemetabolismus
Pema	proteinhaltige Extrazellularmatrix
pfm	Proteine des Fettmetabolismus
pl	isoelektrischer Punkt
PMp	membranständiges Protein
pr	Regulatorische Proteine
pst	Protein der Signaltransduktion
ptm	Proteine des Transmittermetabolismus
RMS	Rostaler migratorischer Strom
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
Rs	Ribosom
S	Synapse
Sc	sekretiert
Scc	Spleißosomen-Komplex
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sER	glattes endozytoplasmatisches Retikulum
sp	Strukturproteine
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
Ss	Synaptosom
SVZ	Subvenrikularzone
Sv	synaptischer Vesikel
TCA	Trichloressigsäure
TOF	Time of flight
tp	Transportproteine
Ulc	Ubiquitin-Ligase Komplex
ZNS	zentrales Nervensystem

Alle nicht aufgeführten Abkürzungen physikalischer Größen und deren Einheiten entsprechen dem SI-System (Système International d'Unité).

1. Einleitung

Das Proteom der unterschiedlichen Teilgebiete des Rattengehirns, des Bulbus olfactorius (oB), des Cerebellums (Ce) und des Cortex cerebri (Co) wurden mit Hilfe der massenspektrometrischen Analyse zu den Zeitpunkten (postnatal P7 (juvenil), P90 (adult), P637 (gealtert)) untersucht, um festzustellen, ob Unterschiede in der Proteinexpression des Gesamtproteoms zu den jeweiligen Zeitpunkten vorhanden sind. Hierbei liegt der Fokus auf Proteinen, die hauptsächlich an Vorgängen der Proliferation, Migration und Differenzierung beteiligt sind. Durch die Analyse dieser Proteine soll ermöglicht werden, dass der Einsatz von Progenitorzellen bei neurodegenerativen Erkrankungen erleichtert bzw. optimiert werden kann.

Im Folgenden wird zu Beginn eine Übersicht zu der prä- und postnatalen Entwicklung des Rattengehirns gegeben. Eine Unterscheidung in der Entwicklung der hier untersuchten Gehirnregionen (oB, Ce, Co) wird anschließend erläutert. Des Weiteren wird auf die Technik der Proteomik, der Natriumdodecylsulfatpolyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) im Allgemeinen wie auch im Bezug zur Neuroproteomik eingegangen. Abschließend erfolgt ein Überblick über die Veränderungen des Mikromilieus während der Entwicklung des zentralen Nervensystems (ZNS) und ein Bezug zu vorangegangenen Arbeiten wird hergestellt.

1.1 Gehirnentwicklung im prä- und postnatalen Stadium der Ratte

Die intrauterine Entwicklung der Ratte dauert insgesamt 22 Tage (embryonal days (E1-E22)), wobei die Neurulation mit E7 beginnt (Cunningham et al., 1994; Adams, 1996). Das ZNS entwickelt sich hierbei hauptsächlich zwischen E14 und E22 (Adlard et al., 1975).

Insgesamt spielt bei der Gehirnentwicklung der Ratte und somit auch bei der Neuroontogenese die sogenannte Neuroplastizität eine wichtige Rolle (Trojan et al., 1999). Hierunter versteht man die Eigenschaft von Synapsen, Neuronen oder auch ganzen Hirnregionen, sich in Abhängigkeit von ihrer biologischen Aufgabe in ihren Eigenschaften anzupassen. Hierbei kann beispielsweise zwischen verschiedenen Formen (evolutionäre, reaktive, adaptive und reparative Plastizität) unterschieden werden (Trojan et al., 2004). Zudem sind weitere Einteilungen möglich (beispielsweise synaptische und kortikale Plastizität). Die synaptische Plastizität beschreibt hierbei die aktivitätsabhängige Änderung der Stärke der synaptischen

Übertragung (Oding, 1949), wobei die kortikale Plastizität mit der aktivitätsabhängigen Änderung der Größe, Konnektivität oder den Aktivierungsmustern in kortikalen Netzwerken stattfindet (Buonomano und Merzenich, 1998). Zusammengefasst kann gesagt werden, dass abhängig von der endogenen Reizform und -dauer seitens der Umwelt eine Veränderung des neuronalen Gewebes erfolgen kann.

Auch im Bezug auf das Gewicht des Gehirns wie auch des Körpergewichts der Ratte können Veränderungen in der Entwicklung festgestellt werden. So kommt es speziell in den ersten zwei postnatalen Monaten zu einem starken Massenzuwachs des Gehirns der Ratte. Speziell zwischen den Tagen P2 und P25 kann hierbei die größte Massenzunahme ermittelt werden, wobei eine weitere Zunahme bis P60 festgestellt werden kann (Bandeira et al., 2009). Zudem findet bis P275 eine weitere Massenzunahme statt, wobei diese jedoch geringer ist und auch insgesamt langsamer verläuft (Kishimoto et al., 1965).

Bezüglich der hiermit verbundenen Prozesse auf zellulärer Ebene, finden auch hier wesentliche Veränderungen während der Gehirnentwicklung statt. So kommt es speziell in den ersten postnatalen Wochen zu einem hohen Maße an migratorischen Vorgängen, beteiligt hieran sind beispielsweise die glialen Progenitorzellen. Während insgesamt die neuronale Migration bis zu der Geburt der Ratte abgeschlossen ist, gibt es auch hier Ausnahmen für einzelne Zelltypen. Beispielsweise findet eine Migration von Interneuronen im rostalen migratorischen Strom (RMS) innerhalb des oB auch im weiteren Verlauf statt. Auch Vertreter der granulären Zellpopulation des Gyrus dentatus bilden eine solche Ausnahme, wobei diese weiter in Richtung des Hippokampus wandern (Cayre et al., 2009). Die Synaptogenese verläuft insgesamt in zwei unterschiedlichen Phasen (frühe Phase (P1-P5), späte Phase (P15-P20)) (Bhattacharya et al., 1991).

In Anbetracht der Anzahl neuraler und nicht-neuraler Zellen, kann auch hier ein Unterschied während der Entwicklung beobachtet werden. So beträgt nach der Geburt die Anzahl nicht-neuraler Zellen 4 Millionen (ca. 6% der Gesamtzellzahl); im adulten Rattenhirn ist hingegen eine Anzahl von 140 Millionen (ca. 50% der Gesamtzellzahl) vorhanden. Ein Großteil dieser nicht-neuralen Zellen stammt hierbei aus der Region des Cerebellums (90%). Speziell hier findet dieser Massenzuwachs zwischen der zweiten und dritten Lebenswoche statt. Insgesamt endet der Zuwachs

nicht-neuraler Zellen (mit Ausnahme des Kleinhirns) dann mit dem Ende der dritten Lebenswoche (Bandeira et al., 2009).

1.1.1 Ontogenese des Bulbus olfactorius

Während der Ontogenese des oB, einer rostralen Vorwölbung der Großhirnhemisphären, kommt es zum Zeitpunkt der Geburt zu einer Ausweitung dieser, sodass die Bulbi olfactorii postnatal den am weitesten rostral gelegenen Punkt des Rattenhirns bilden (Paxinos, 2004). Insgesamt kommt es zu einer Zellzunahme innerhalb der zweiten und dritten Lebenswoche, insbesondere von nicht-neuralen Zellen. Nach der dritten Lebenswoche kann keine weitere Zunahme nicht-neuraler Zellen gemessen werden (Bandeira et al., 2009).

Bei der Neurogenese des oB muss zwischen dem Haupt-Bulbus olfactorius (HoB) und dem akzessorischen Bulbus olfactorius (AoB) unterschieden werden, wobei der AoB in der dorsal-posterioren Region neben dem HoB lokalisierbar ist. Neurone werden jedoch nach einer strikten Abfolge in beiden Teilen gebildet. Zum Zeitpunkt der Geburt sind eine hohe Anzahl an Mitralzellen und nur wenige Interneurone vorhanden (Imamura et al., 2011). Mit steigendem Alter nimmt die Menge an Interneuronen zu. Der Beginn der eigentlichen Neurogenese erfolgt ab E12-P20, diese setzt sich jedoch bis in das Erwachsenenalter fort. Zum gleichen Zeitpunkt werden auch neuronale Progenitorzellen produziert. Bezüglich des HoB kann gesagt werden, dass hierbei die Generierung von Ausgangsneuronen, beginnend mit der Genese der ersten Mitralzellen bis hin zu den interstitiellen Büschelzellen, erfolgt. Das Vorkommen von Interneuronen geschieht in diesem Gebiet erst, nachdem die Ausgangsneurone produziert wurden. Im AoB, im Gegensatz zum HoB, erfolgt die Genese der Ausgangsneurone schon bevor die jeweiligen Mitralzellen in dieser Region generiert werden. Auch die Interneurone des AoB werden eher gebildet als die des HoB. Insgesamt erfolgt in dieser Region zuerst die Genese von Ausgangsneuronen, danach folgen die Granularzellen und abschließend die periglomerulären Zellen (Bayer et al., 1983).

Bezüglich der Projektion des oB und seinen jeweiligen Zielgebieten kann gesagt werden, dass durch die Verknüpfung vom HoB und AoB vor allem die Mitralzellen eine Stufe darstellen, die das Auswachsen der Axone in das Telencephalon vorantreiben. Besonders die kortikomediale Amygdala ist eines der am besten untersuchten Gebiete bezüglich der olfaktorischen Projektionsgebiete. Der HoB

endet hierbei vor allem in den Kernen des lateralen olfaktorischen Trakts sowie in den anterior-kortikalen und postolateral-kortikalen Kernen. Die Zielregion des AoB hingegen ist primär in den Kernen des akzessorischen olfaktorischen Trakts sowie den medialen und posteromedialen Kernen zu finden (Clark und Meyer, 1947; Girgis und Goldby, 1967; Skeen und Hall, 1977). Innerhalb der Amygdala werden Neurone vor allem in Abhängigkeit eines posterioren Gradienten generiert, wobei sich hier das Projektionsgebiet der Neurone des AoB ein wenig eher entwickelt als das des HoB, bevor die olfaktorischen Fasern dieses Gebiet erreichen (Bayer et al., 1983).

Es ist außerdem wichtig zu erwähnen, dass die Interneurone des oB einzigartige Eigenschaften aufweisen. Das Besondere ist, dass eine Neurogenese auch im Erwachsenenalter geschieht, vor allem in den Granularzellen des HoB (Kaplan und Hinds, 1977). Hierbei ist die Generierung und Integration von neuen Neuronen möglich, da der RMS der Subventrikularzone (SVZ) diese, beispielsweise bei einem Verlust, erneuern kann (Smart, 1961; Altman, 1969; Reynolds und Weiss, 1992; Okano et al., 1993; Lois und Alvarez-Buylla, 1993). Somit präsentiert dieses Gehirnareal eines der wenigen neurogenerativen Regionen des Gehirns, die bis in das Erwachsenenalter aktiv sind (Schema dargestellt in Abb. 1 (c)). Hierbei kommt es zu einer ständigen Proliferation und Differenzierung von Progenitorzellen hin zu Granular- und Perigranularzellen innerhalb des oB (Lois und Alvarez-Buylla, 1993; Shimada, 1966; Bayer, 1983; Kishi, 1987; Luskin, 1993). Die Progenitorzellen migrieren dabei von der SVZ zu ihrem jeweiligen funktionellen Zielort. Studien von Luskin (1993), Lois und Alvarez-Buylla (1993) sowie Luskin und Boone (1994) konnten zeigen, dass die Geschwindigkeit innerhalb des RMS ca. 5 mm pro Woche in einer adulten Ratte beträgt. Hierbei verteilen sich die Zellen in radiärer Form in Richtung der granulären und periglomerulären Schichten, wo dann die Differenzierung in Neurone erfolgt (Lois und Alvarez-Buylla, 1993; Luskin, 1993; Lois und Alvarez-Buylla, 1995).

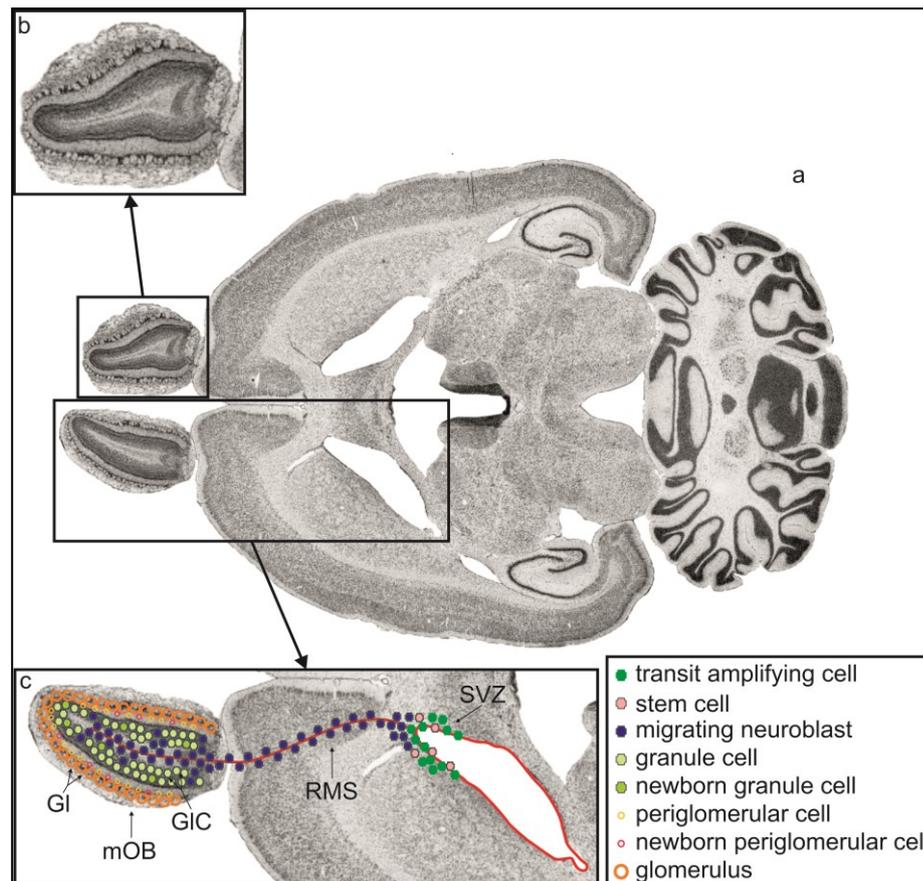


Abbildung 1: Übersicht des Rattenhirns mit Bezug auf den oB. (a) Horizontalschnitt des Rattenhirns.(b) Vergrößerte Ansicht des oB. (c) Schematische Übersicht der Migration von olfaktorischen Vorläuferzellen innerhalb des RMS (mOB=HoB; aus Wille et al., 2015 (a)).

Insgesamt kann jedoch auch in diesem Bereich des ZNS eine Abnahme der Neurogenese mit steigendem Alter beobachtet werden. Außerdem kann keine signifikante Änderung in der Anzahl an Granularzellen des HoB im Vergleich von juvenilen Tieren und Tieren, die das 1. Lebensjahr erreicht haben, beobachtet werden. Dieser Zustand könnte durch den Ausgleich zwischen der Genese der Granularzellproduktion und dem gleichzeitigen Absterben dieser Zellen in gleicher Menge begründet sein (Roselli-Austin und Altman, 1979). Bezüglich der Synaptogenese repräsentieren die olfaktorischen Glomeruli die erste Stufe in der Verwertung an Information innerhalb dieser Region. Die sensorischen Axone des oB projizieren zu den jeweiligen Glomeruli, wo dann eine dementsprechende Weiterleitung über Synapsen zu den primären Dendriten der Projektionsneurone geschieht (Vassar et al., 1994; Mombaerts et al., 1995). Die Generierung der Synaptogenese erfolgt in der embryonalen Entwicklung innerhalb des Glomerulus zum Zeitpunkt E18 (Gesteland und Sigwart, 1977; Moriizumi et al., 1995) wie auch hauptsächlich in den ersten postnatalen Tagen (Guthrie und Gall, 2003). Insgesamt kann von einer Zunahme der Synapsendichte zwischen P0 und P10 ausgegangen

werden. Zudem nimmt auch die Dichte der myelinisierten Axone im lateralen oB während dieser Zeit zu. Auch nach diesen Zeitpunkten kann eine weitere Zunahme von neu erstellten Synapsen (P21 und darüber hinaus) gemessen werden (Moriizumi et al., 1995).

1.1.2 Ontogenese des Cerebellums

Das Ce ist auf Höhe des Rhombencephalons lokalisiert und entwickelt sich aus den rostralen Schenkeln der Rautenlippen. Es spielt eine zentrale Rolle in der motorischen Anpassung der Ratte an dessen Umwelt sowie der Konditionierung bei Lernvorgängen und der Feinabstimmung der Motorik (Ghez und Fahn, 1985). Innerhalb der ersten drei postnatalen Wochen kommt es innerhalb dieser Region zu einer vollständigen Integration des Gehirnareals in den Funktionskreis des neuronalen Systems der Ratte (Paxinos, 2004).

Der Massenzuwachs findet hauptsächlich direkt nach der Geburt statt. So kommt es innerhalb der ersten drei postnatalen Monate zu einer Erhöhung der Masse (Faktor: 20,7). Bis zum Zeitpunkt der Adoleszenz (P25-P60) der Ratte kann hingegen keine Zu- bzw. Abnahme in der Zellzahl festgestellt werden. Auch für die Anzahl von Neuronen kann eine Zunahme von 150 Millionen Zellen zwischen dem Zeitpunkt der Geburt und dem Erwachsenenalter beobachtet werden. Während es innerhalb des kompletten Rattengehirns zu einer Erhöhung an nicht-neuralen Zellen innerhalb der zweiten und dritten Lebenswoche kommt, ist innerhalb des Ce ein Verlust von fast 50% der Zellen zwischen P17 und P25 zu beobachten. Anschließend erfolgt ein Anstieg von nicht-neuralen Zellen um ca. 60% bis in das Erwachsenenalter (Bandeira et al., 2009). Bezüglich der Gesamtzellzahl innerhalb des Rattengehirns ist das Ce die einzige Region, welche einen zusätzlichen Anstieg innerhalb der ersten postnatalen Woche zu verzeichnen hat. Speziell in der ersten wie auch in der dritten postnatalen Woche kommt es hier zu einer Erhöhung der Anzahl von Zellen (Cayre et al., 2009). Außerdem konnte festgestellt werden, dass sich auch die Größe der Zellen des Ce während der Entwicklung verändert. Während der Neurogenese kommt es beispielsweise zu einer Größenabnahme granulärer Neurone. Innerhalb der ersten zwei postnatalen Lebenswochen werden zudem die exzitatorischen Neurone von den granulären Progenitorzellen innerhalb der äußeren Keimschicht gebildet (Bhattacharya et al., 1991; siehe Abb. 3). Durch Proliferation kommt es hierbei anschließend zur Bildung einer großen Menge an neuronalen Zellen.

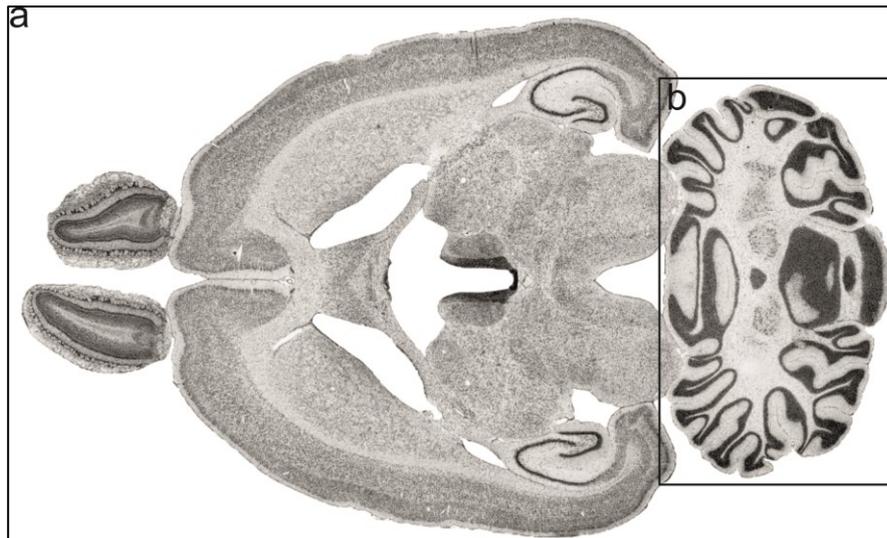


Abbildung 2: Übersicht des Rattenhirns mit Bezug auf das Ce. (a) Horizontalschnitt des Rattenhirns. (b) Vergrößerte Ansicht des Ce (aus Wille et al., 2015 (b)).

Nach Beendigung der Mitose beginnen diese Zellen damit, ihre Axone bilateral durch die Molekularschicht zu verlängern. Am Tag 3 erfolgt dann eine Migration der Granularzellen hin zur inneren Molekularschicht. Anschließend kann ein apoptotischer Abbau der Granularzellpopulation innerhalb der ersten drei Lebenswochen beobachtet werden, um wahrscheinlich so eine optimale Verbindung zwischen den Zellen etablieren zu können (Migheli et al., 1999). Auch weitere Zelltypen, beispielsweise die Bergmann Gliazellen, spielen eine wichtige Rolle bei der Migration und Differenzierung der Granularzellen und unterstützen sie hierbei. Sobald die Granularzellen die innere Keimschicht erreichen, kommt es zu einer Kontaktaufnahme zwischen den exzitatorischen afferenten Moosfasern und den inhibitorisch wirkenden Golgi Zell-Axonen. Gleichzeitig werden hierbei zusätzlich Parallelfasern am oberen Teil der Molekularschicht generiert. Mit Hilfe der distalen Dendriten der Purkinjezellen ist es nun möglich, synaptische Verbindungen mit den Parallel- und Kletterfasern auszubilden. Die Synaptogenese besitzt ihren Höchstwert in der zweiten und dritten postnatalen Woche (Altman, 1982; The BrainTx Committee NIJC, 2014), wobei die Purkinjezellen am Transport im cerebellaren Kortex zu den Kernen des Cerebellums hauptsächlich beteiligt sind.

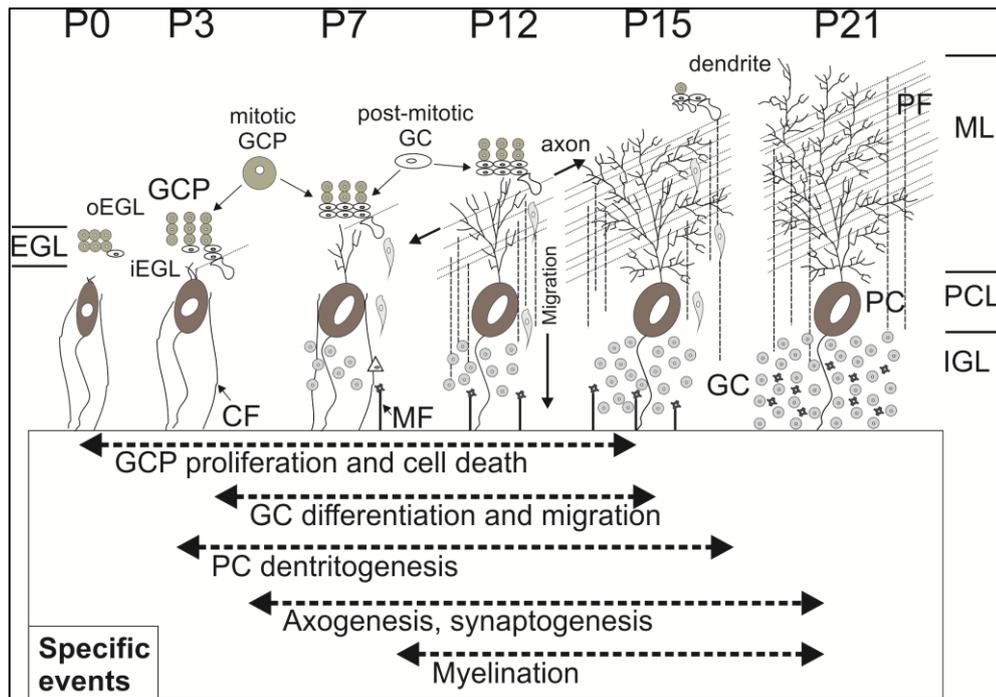


Abbildung 3: Schematische Übersicht der Hauptzeitpunkte der postnatalen Entwicklung des cerebellaren Kortex. Die Granularzellen (GCs) werden durch die Proliferation von granulären Vorläuferzellen (GCPs) der äußeren Granularzellschicht (EGL) während der ersten und zweiten Woche nach der Geburt gebildet. Nach der bilateralen Extension der post-mitotischen Parallelfaseraxone (PF) migrieren die Zellkörper durch die sich entwickelnde Molekularschicht (ML) und siedeln sich innerhalb der inneren Granularschicht (IGL) an, welche sich unter der Purkinjezellschicht (PCL) befindet. Die EGL kann in zwei Schichten unterteilt werden: die äußere EGL (oEGL) besitzt proliferierende GCPs, wobei die innere Schicht (iEGL) post-mitotische GCs beinhaltet. Die Bergmann Gliazellen (BG) breiten sich zudem in die ML aus, um so die GCs zu leiten, die den IGL erreichen. Nach der Differenzierung und zusätzlicher Verlängerung der Dendriten in Glomeruli wird eine Verbindung der GCs hin zu den exzitatorisch afferenten Moosfasern (MFs) und inhibitorischen Golgizellaxonen möglich. Von den Purkinjezellen (PCs) erfolgt dann ein verstärkter Auswuchs ihrer Dendriten, wovon die PCs jeweils zwei exzitatorische Eingänge der PFs und der Kletterfasern (CFs) erhalten (aus Wille et al., 2015 (b)).

Zusätzlich kommt es jedoch auch schon innerhalb der ersten postnatalen Woche zu einzelnen synaptischen Verbindungen zwischen Parallelfasern und Korbzellen. Der Input der Moosfasern in die Granularschicht erfolgt das erste Mal um den fünften postnatalen Tag herum (Altman und Bayer, 1997). Ab P12 ist dann eine komplette Synapsenformation zwischen Moosfasern und granulären Zelldendriten etabliert, wobei gleichzeitig die Golgizellen beginnen, ihre inhibitorisch wirkenden synaptischen Verbindungen hin zu den granulären Zellen des Glomerulus aufzubauen. Bezüglich der inhibitorischen Interneurone (Sternzellen, Korbzellen und Golgizellen) kann gesagt werden, dass diese innerhalb der ersten und zweiten postnatalen Woche proliferieren, um anschließend zu ihrem Zielstandort zu migrieren. Die Proliferation und Differenzierung weiterer Zelltypen (beispielsweise Oligodendrozyten) sowie die Myelinisierung innerhalb des Ce (der inneren

Granularschicht) scheint dabei um P10 herum zu starten und sich bis hin in die dritte postnatale Woche fortzusetzen (Mason und Gregory, 1984; The BrainTx Committee NIJC, 2014). Zusätzlich können auch Veränderungen in der Morphologie der synaptischen Verbindungen, z.B. in den cerebellaren Glomeruli, bis in das hohe Alter der Tiere festgestellt werden, welches durch das Ersetzen und Erstellen von neuen synaptischen Verbindungen erklärt werden kann (Bertoni-Freddari et al., 1986).

1.1.3 Ontogenese des Cortex cerebri

Der Co entwickelt sich aus dem Prosencephalon und kann zum Zeitpunkt der Geburt zwischen dem oB und dem Diencephalon lokalisiert werden (Paxinos, 2004).

Die Entwicklung des Co unterteilt sich in verschiedene Phasen. Ausgehend von der dreischichtigen Struktur, der Ventrikulärzone, der Intermediärzone und der frühen Marginalzone (Preplate) entsteht durch die Migration von postmitotischen Neuronen eine neue Schicht zwischen der Preplate und der Intermediärzone, welche man als kortikale Platte bezeichnet und dicht gepackte, radiär angeordnete Zellstrukturen aufweist. Die Ventrikulärzone kann durch eine zusätzliche Teilung in eine innere und äußere Ventrikulärzone unterteilt werden, wobei die innere eine höhere Zelldichte besitzt als die äußere (Angevine und Sidman, 1961; Hicks und D'Amato, 1968; Meyer et al., 2000; Supèr et al., 2000). Eine Einwanderung von Neuronen kann aufgrund dieser Struktur in die kortikale Platte stattfinden (Edmondson und Hatten, 1987; Hatten, 1990). Nach erfolgreicher Differenzierung ist die Bildung von synaptischen Kontakten möglich (Rakic, 1972). Bezüglich der kortikalen Platte kann diese in der weiteren Entwicklung in die obere Marginalzone und die darunter liegende Subplate unterteilt werden (Kostovic und Rakic, 1990). Die Zellen der Subplate besitzen hierbei Eigenschaften von ausdifferenzierten Neuronen und können daher von afferenten Nervenfasern kommende synaptische Information verarbeiten (Shatz et al., 1990). Zusätzlich ist eine Projektion der Neurone selbst in die kortikale Platte sowie den Thalamus und den Colliculus superior möglich (McConnell et al., 1989).

Bezüglich der Massenzunahme besitzt der Co während der ersten postnatalen Woche den höchsten Wert. In den darauffolgenden Wochen des ersten postnatalen Monats findet zwar noch ein Wachstum statt, eine geringere Zunahme konnte jedoch dabei festgestellt werden. Zudem nimmt die Masse wiederum zwischen P25 und P60 ab, was als Kennzeichen der Adoleszenz angesehen werden kann (Bandeira et al.,

2009; Doremus et al., 2004). Anschließend kommt es dann ebenfalls nur noch zu einer geringen Zunahme an Zellen innerhalb des Co.

Insbesondere die Anzahl an Neuronen nimmt in den ersten Tagen nach der Geburt innerhalb des Neocortex und des Hippokampus stark zu, sodass zwischen 1-5 Millionen Neurone innerhalb von vier Tagen generiert werden. Insgesamt führt dies zu einer Zunahme von ca. 24 Millionen Neuronen innerhalb des Neocortex und ca. 4 Millionen innerhalb des Hippokampus. Anschließend kommt es dann zu einer starken Abnahme der Gesamtzellzahl (60-70% der Neurone innerhalb der zweiten postnatalen Woche) innerhalb dieser Gebiete (Bandeira et al., 2009).

1.2 Proteomik

Das Proteom ist als die Gesamtheit aller Proteine, welche von einem Genom, der Zelle oder des Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt exprimiert wird, definiert. Mit Hilfe der Analyse des Proteoms ist es möglich, Veränderungen in der Proteinexpression, beispielsweise auch eine Abundanz einzelner Proteine, zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu detektieren. Der Begriff „Proteomik“ beschreibt die Analyse der Gesamtheit der Proteine eines Organismus oder seiner Unterstrukturen und wurde im Jahre 1994 von Marc Wilkins das erste Mal verwendet. Seit diesem Zeitpunkt hat sich die Proteomik in zahlreiche unterschiedliche Teildisziplinen aufgeteilt.

Die Technik der Proteomik hat sich in den letzten 35-40 Jahren stark weiterentwickelt und ist in der heutigen Zeit ein Forschungsfeld, dass in den Bereichen der Proteinseparation, Massenspektrometrie, der Genom-Sequenzierung/Annotation sowie den Protein-Such-Algorithmen wesentliche Verbesserungen erfahren hat. Alleine in den letzten 10 Jahren ermöglichten diese Optimierungen vorangegangene Problematiken in der Proteinidentifikation zu minimieren und die Proteomik heute zu einem Standardverfahren zu etablieren.

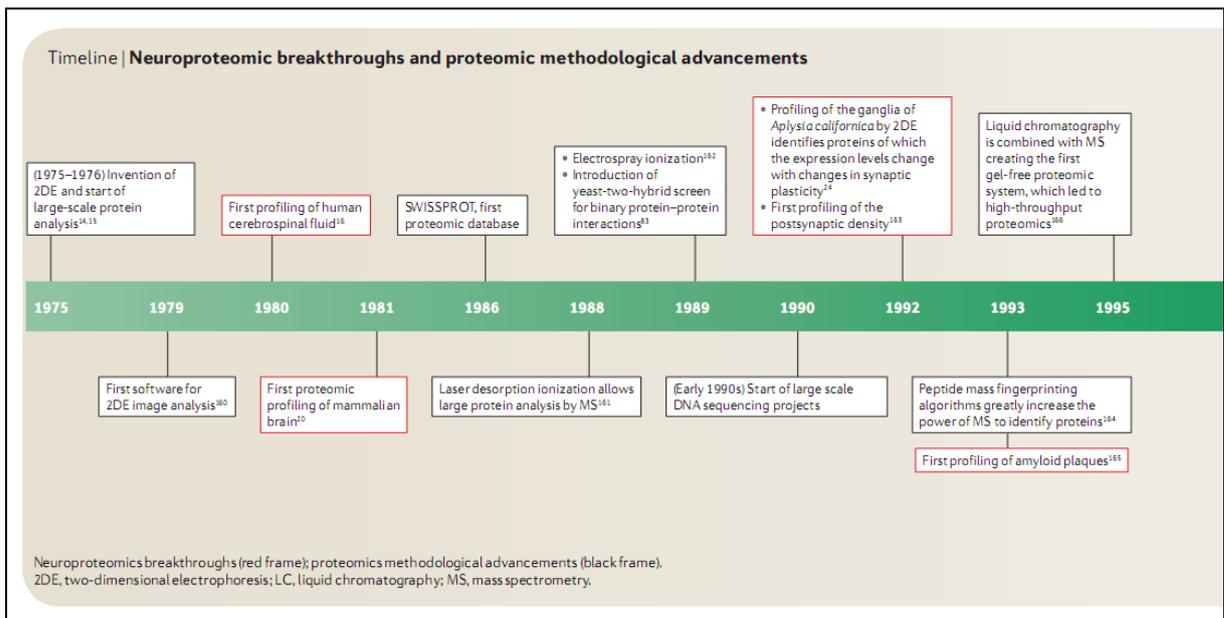


Abbildung 4: Übersicht der methodischen Verbesserungen innerhalb der (Neuro-) Proteomik (aus Bayés und Grant, 2009).

Für die Protein- und Peptid-Separation haben sich mittlerweile hauptsächlich drei unterschiedliche Techniken etabliert: Die denaturierende Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese ((polyacrylamide gel electrophoresis), PAGE oder auch SDS-PAGE), die zweidimensionale Gelelektrophorese ((two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis), 2D-PAGE) und die Flüssig-Chromatographie ((liquid chromatography), LC) (Thelen, 2003). Im Folgenden wird näher auf die Methodik der PAGE und 2D-PAGE eingegangen, da diese die Proteinseparationstechniken darstellen, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

1.2.1 Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese (PAGE)

Diese Technik, welche der Proteinseparation dient, wurde zum ersten Mal im Jahre 1970 von Laemmli erwähnt. Mit diesem Verfahren ist es möglich, dass die Proteine abhängig von ihrer Größe, dem Molekulargewicht, mit hoher Reproduzierbarkeit und wenig Aufwand erfolgreich aufgetrennt werden können. Trotz dieser Vorteile ist das Auflösungsvermögen dieser Methode begrenzt. Die massenspektrometrische Analyse einer einzelnen Bande einer solchen Proteinprobe kann demnach eine Anzahl von zehn und mehr Einzelproteinen enthalten (Phinney und Thelen, 2005). Für eine höher konzentrierte Probe mit einer geringen Komplexität ist diese Auftrennungsmethode jedoch eher geeignet und stellt daher eine Möglichkeit dar, eine Proteinmischung schnell und reproduzierbar aufzutrennen (Thelen, 2003).

1.2.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-PAGE)

Bei dieser analytischen Teil-Methodik der Gelelektrophorese, welche 1975 von O'Farrel und Klose entwickelt wurde, wird eine isoelektrische Fokussierung (IEF) mit der eigentlichen Proteinseparation durch die Gelelektrophorese kombiniert und so ein wesentlich höheres Auflösungsvermögen in der Trennung erreicht. In der ersten Dimension (IEF-Fokussierung) erfolgt hierbei eine Separation der Proteine anhand eines pH-Gradienten innerhalb eines elektrischen Feldes. Aufgrund der sauren und basischen Aminosäurereste erfolgt wegen des umgebenden pH-Werts eine unterschiedliche Ladung des Proteins. Ist der isoelektrische Punkt (pI) erreicht, erfolgt eine Aufhebung der Ladung, sodass sich für das Protein eine Nettoladung von Null ergibt. Daraus folgt, dass das Protein an dieser Stelle nicht mehr wandert und sich hier ablagert. Abschließend erfolgt dann die Auftrennung der Proteine anhand der vorab aufgeführten PAGE.

Durch diese Art der Proteinseparation und deren vorangegangenen Verbesserungen (Görg et al., 1978) in der Reproduzierbarkeit und Auflösung sowie der Probenbeladung ist es mittlerweile möglich auch komplexe Proteinproben zu analysieren. Trotz des Nachteils, dass mit Hilfe dieser Methode eine vollständige Analyse von Membranproteinen nicht möglich ist (Santoni et al., 2000), stellt dies jedoch eine der effektivsten Methoden dar, um eine quantitative Analyse von komplexen Proteinproben vorzunehmen.

1.2.3 Proteinidentifikation mit Hilfe der Massenspektrometrie

Die Analyse einer Probe mit Hilfe der Massenspektrometrie benötigt zunächst eine Ionisierung des betreffenden Moleküls sowie daraus resultierend dessen Eintritt in die Gasphase. Zwei unterschiedliche Ansätze sind hierbei möglich: Elektronenspray-Ionisation (ESI) und Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (matrix assisted laser desorption ionization, MALDI). Bei beiden Techniken besteht die Möglichkeit, dass Makromoleküle wie zum Beispiel Proteine in flüssiger Lösung, wie auch in einem trockenen, kristallinen Zustand analysiert werden können (Fenn et al., 1989; Tanaka et al. 1988; Karas und Hillenkamp, 1988). Im Folgenden wird die Technik MALDI-TOF genauer beschrieben, da eine Verwendung dieser Technik auch in der vorliegenden Arbeit stattgefunden hat. Der Zusatz „TOF“ (Time of flight) beschreibt hierbei das Prinzip der massenspektrometrischen Analyse, bei der das Masse-zu-Ladung-Verhältnis durch Messung der Flugzeit bestimmt wird. Hierbei feuert ein

Laser auf das Analyt, welches sich getrocknet und unter Vakuumbedingungen auf dem Probenträger befindet. Zusätzlich ist die Probe hierbei mit einer Matrix assoziiert (ein organisches Molekül, welches zur Absorption des UV-Lichts des Lasers dient). Bei Beschuss der Probe mit dem Laser resultiert hieraus eine Verdampfung der Matrix inklusive des assoziierten Analyts. Die hierbei durch das elektrische Feld beschleunigten Ionen werden im Gegensatz zu anderen Techniken simultan gemessen, was den Vorteil bietet, dass sehr schnelle Messungen (100.000 komplette Massenspektren pro Sekunde) bei gleichzeitig wegfallender Einschränkung durch den Massenbereich erstellt werden können. Eine Einschränkung der Masse erfolgt theoretisch hierbei nur durch die eigentliche Elektronik. Zusätzliche Vorteile in der Sensitivität, die sich hieraus ergeben, bieten die Möglichkeit, dass hierbei nur Molekülionen erzeugt und detektiert werden und somit auch eventuelle Polymerverteilungen aufgezeigt bzw. analysiert werden können (Thelen, 2003; Berchter et al., 1997).

1.2.4 Neuroproteomik

Das Gebiet der Neuroproteomik kann grundsätzlich in unterschiedliche Konzepte/Kategorien unterteilt werden. Die vier Hauptkategorien sind hierbei die Neuroproteomik mit dem Schwerpunkt bezüglich der Expression von Proteinen, die funktionelle Neuroproteomik, die klinische Neuroproteomik sowie die Neuroproteomik im Bezug auf die Analyse mit Methoden der Bioinformatik.

1.2.4.1 Neuroproteomik mit dem Schwerpunkt zur Analyse der Expression von Proteinen

Die Expressions-Proteomik stellt die älteste Form der Proteomik dar. Die Hauptaufgabe der Expressions-Proteomik besteht in der Analyse von Proteinen innerhalb einer Probe. In jüngerer Vergangenheit hat sich der Fokus hierbei vor allem auf die Quantifikation einzelner Proteine konzentriert (Ong und Mann, 2005; Föcking et al., 2006). Die hierbei am häufigsten angewandte Methode ist die Proteinseparation mit Hilfe der Gelelektrophorese. Der Fokus hierbei liegt vor allem in der Analyse von Proteinen, die beispielsweise ein sehr geringes bzw. hohes Molekulargewicht, einen sehr sauren oder basischen pH-Wert besitzen oder auch in einer geringen Menge vorhanden sind (Bayés und Grant, 2009).

1.2.4.2 Funktionelle Neuroproteomik

Die funktionelle Neuroproteomik beschäftigt sich mit den funktionellen Unterschieden im Bezug auf die posttranslationalen Modifikationen, deren Organisation in Unterstrukturen, Komplexe und Netzwerke. Durch diese Technik wird eine detailliertere Untersuchung, beispielsweise die der Zusammensetzung von Neuronen und Synapsen, ermöglicht. Des Weiteren ist es somit möglich, diese meist in Multi-Proteinkomplexen organisierten Verbände z.B. auf Unterschiede des Phosphorylierungsgrades oder generelle Verschiedenheiten in deren physiologischen Aspekten zu untersuchen (Whittaker et al., 1964).

1.2.4.3 Klinische Neuroproteomik

Aufgrund der Eigenschaften der Proteomik ist es möglich eine hohe Anzahl an Proteinen zu analysieren. Somit ist es beispielsweise auch anhand dessen möglich, biochemische Veränderungen in Proben von krankhaftem Gewebe zu detektieren. Da in der heutigen Zeit noch viele Fragen im Bezug zu neurologischen Erkrankungen offen sind, wird dieser Zweig der Proteomik im Verbund mit der Neuropathologie in Zukunft von noch höherem Interesse sein (Bayés und Grant, 2009).

1.2.4.4 Neuroproteomik mit bioinformatischem Hintergrund

Ein wichtiger Punkt in der Proteomanalyse liegt zudem im bioinformatischen Umgang mit den erhaltenen Daten. Da normalerweise bei einer solchen Analyse eine hohe Menge an Daten anfällt, ist ein verantwortungsvoller Umgang dieser im Bezug zu den biologischen Prinzipien von Nöten (Hye et al., 2006). Das Anlegen einer konsistenten Datenbank mit den jeweiligen Proteininformationen (beispielsweise: Proteinidentifikation und Funktionsweise, Interaktionsmöglichkeiten und Zuordnung in Stoffwechselwegen, Expressionsmuster, phenotypische und physiologische Funktionen, Information zu den jeweiligen posttranslationalen Modifikationen, usw.) hat sich hierbei als hilfreich herausgestellt. Mit Hilfe dieser ist es nun möglich, dass die durch ein Experiment erhaltenen Daten mit aktuellen Proteinanalysen abgeglichen und/oder erweitert werden können (Bayés und Grant, 2009).

1.3 ZNS-Entwicklung und Veränderungen des Mikromilieus

Ziel dieser Arbeit ist es, Unterschiede in der Entwicklung des Rattenhirns mit Fokus auf Expressionsunterschiede innerhalb der Gehirngebiete des oB, Ce und Co zu unterschiedlichen Zeitpunkten (P7, P90, P637) zu untersuchen.

Als Basis dieser Zielsetzung dienen die Arbeiten von Howakimyan et al. (2006) und Haas et al. (2008) sowie die Studien von Lessner et al. (2010). So beschäftigen sich diese Studien zum einen mit der Transplantation von immortalisierten Progenitorzellen in 6-OHDA Hemiparkinson Maus-Modellen (Howakimyan et al., 2006; Haas et al., 2008), zum anderen mit den Expressionsunterschieden in den auch hier untersuchten Gehirnarealen zu weiteren Zeitpunkten in der Entwicklung (Lessner et al., 2010).

So konnte von Howakimyan et al. (2006) und Haas et al. (2008), wie auch von Schwarz und Freed (1987) in ihren Arbeiten festgestellt werden, dass speziell das Mikromilieu in neonatalen Gehirnen eine geeignete Grundlage für die Generierung von Stammzellen mit dem Fokus auf Proliferation und Differenzierung darstellt.

Durch die genauere Charakterisierung der Expressionsmuster in den untersuchten Gebieten sollte es möglich sein Vertreter zu bestimmen, die einen Einfluss auf das Überleben und die Differenzierung von transplantierten Progenitorzellen in neonatale und adulte Caudatus-Putamen Komplexe darstellen bzw. deren Entwicklung zu optimieren. In der Vergangenheit wurden zwar verschiedene Studien vorgenommen, die sich mit den Eigenschaften der untersuchten Zellen selbst beschäftigen, nicht jedoch mit den sich dadurch ergebenden Veränderungen im ZNS. So spielen hierbei beispielsweise Faktoren, wie Zell-Zell-Interaktionen, die Signalweiterleitung und regulatorische Prozesse eine wichtige Rolle, die eine Differenzierung von neuronalen Stammzellen zu beeinflussen scheinen. So sollen mit dieser Arbeit Hinweise gefunden werden, welche Proteine/Faktoren bei der neuronalen Differenzierung von Relevanz sind und die Integration von neuronalen Stammzellen in das neonatale Gewebe beeinflussen können.

1.4 Fragestellung

Bis heute wurden verschiedene Studien, welche die Proteinexpression an unterschiedlichen Regionen des sich in der Entwicklung befindlichen Nervensystems untersucht, vorgenommen. Diese beschreiben die differentielle Expression innerhalb dieser Gehirnareale, wobei meist nur ein spezieller Zeitpunkt gewählt ist, beziehungsweise sich die Untersuchung der Expressionsunterschiede nur auf eine bestimmte funktionelle Klasse an Proteinen beschränkt. Häufig werden auch nur Proteomanalysen von Gesamthomogenaten von Versuchstierhirnen publiziert, ohne Spezifikation von speziellen Regionen oder funktionellen Systemen.

Der Fokus dieser Arbeit hingegen liegt in der Analyse, beziehungsweise dem Vergleich von drei Gehirnarealen (oB, Ce, Co) zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten (P7, P90, P637).

Folgende Fragen sollen mit Hilfe dieser Arbeit beantwortet werden:

1. Gibt es Unterschiede in der Expression innerhalb der funktionellen Proteingruppen zu den gewählten Zeitpunkten für die unterschiedlichen Gehirnareale?
2. Sind Expressionsmuster analysierbar, die in allen drei Gehirnregionen in gleicher Form auffindbar sind?
3. Ist eine Identifizierung von Proteinen möglich, die an neuronalen Proliferations-, Migrations- oder Differenzierungsvorgängen beteiligt sind?

2. Material und Methoden

Die im Folgenden verwendeten Protokolle stellen den standardisierten Verlauf dar, der im Institut für Anatomie der Universität Rostock für die Analyse des Proteoms unterschiedlicher Gehirnareale verwendet wird. Die Gewährleistung der höchstmöglichen Vermeidung der Kontamination der Proben wurde unter Zuhilfenahme von Handschuhen, Mundschutz und Haarhauben sichergestellt. Die jeweiligen Bestandteile der genannten Lösungen sowie die Bezugsquellen für die einzelnen Chemikalien und Laborgeräte befinden sich im Anhang.

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche Wistar Ratten (*Rattus norvegicus*, Charles River, Sulzfeld, Deutschland), jeweils 6 Versuchstiere pro Gruppe, verwendet, welche pro Gruppe unterschiedliche Altersstufen (P7, P90 und P637 Tage) aufwiesen (International Genetic Standardization (IGS) Program; Pass und Freeth, 1993). Die Tiere wurden unter einem künstlichen Tag-Nachtrhythmus bei einer Temperatur von $22 \pm 2^\circ \text{C}$ gehalten, wobei ein freier Zugang zu Wasser und Standardnahrung bestand. Insgesamt stehen die Haltung der Tiere sowie auch die experimentelle Vorgehensweise in Einklang mit den zu dem Zeitpunkt aktuellen Vorschriften des Tierschutzgesetzes (Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg Vorpommern, Deutschland) sowie der Tierpflege- und Gebrauchsverordnung der Universität Rostock. Anhand der Richtlinie der europäischen Gemeinschaften des 24. November 1986 (86/609/EEC) sowie der zuvor aufgeführten lokalen Richtlinien wurde sichergestellt, dass eine für die Versuchstiere möglichst schmerzfreie und angepasste natürliche Lebensweise gegeben war.

2.2 Perfusion und Präparation

Die jeweilige Perfusion der Versuchstiergruppen erfolgte zu den angegebenen definierten Zeitpunkten (7, 90, 637 Tage nach der Geburt). Die Tiere wurden hierzu mit Äther betäubt und unter Zuhilfenahme von intraperitonealer Pentobarbital- Na^+ -Injektion (60 mg/kg KW) getötet. Die transkardiale Perfusion wurde mit 100-400 ml (abhängig von dem jeweiligen Körpergewicht der Versuchstiere) auf 4°C heruntergekühlte 0,9% NaCl- Lösung vorgenommen. Nach der jeweiligen Dekapitation der Tiere sowie der Entnahme des Gehirnmaterials der einzelnen Regionen, wurde

dieses innerhalb einer kurzen Zeit (maximal 5 min) gewogen und bei -80°C bis zum Vorgang der Homogenisierung aufbewahrt.

2.3 Homogenisierung

Der Vorgang der Homogenisierung dient dem Aufschluss von Gewebe, Zellen und den Zellorganellen, um sie somit der anschließenden gelelektrophoretischen Auftrennung zugänglich zu machen. Zusätzlich erfolgten ein Schockfrieren und eine mechanische Behandlung (Ultraschallbad-Behandlung, Pottern) des Homogenats, um so einer möglichen Aggregatbildung der enthaltenen Proteine entgegenzuwirken und diese zu lösen. Anschließend wurde dem Homogenat ein hoher Anteil an Lipiden durch Zentrifugation entzogen, um so die Proteinanalyse so genau wie möglich vornehmen zu können. Abschließend wurden die Proben unter Kühlung weiterverarbeitet, um postmortale Änderungen in der Proteinzusammensetzung so gering wie möglich zu halten.

Die Proteinextraktion wurde mit Hilfe standardisierter Versuchsprotokolle vorgenommen (Klose und Kobalz, 1995; Lorenz et al., 2003). Das jeweilige Gehirnmaterial wurde mit Lysispuffer ($9 \times [\text{Masse des Gehirnmaterials in mg}]$ in μl) sowie mit einem Mix aus Proteaseinhibitoren und zusätzlich mit Pepstatin A und PMSF ($0.1 \times \text{Probenmasse [mg]}$) μl Pepstatin A und PMSF) versetzt und bei -150°C schockgefroren. Anschließend wurden die Proben wieder aufgetaut und in einen 2 ml Potter überführt, um sie zu homogenisieren. Danach wurden sie zurück in ein Eppendorfgefäß gegeben und mit einer definierten Anzahl an Glasperlen ($0,034 \times V_{\text{gesamt}} \mu\text{l}$) von 1,0 mm Durchmesser versetzt, bis zur Probenhöhe in ein mit Eis vorgekühltes Ultraschallbad eingetaucht und optimal beschallt (15 sek). Ein Vortexen für 15 sek und Schwenken der Probe in Eiswasser für 30 sek folgte anschließend. Nach einer insgesamt sechsfachen Wiederholung dieser Schritte wurde das Homogenat in ein Eppendorfgefäß pipettiert und bei -150°C schockgefroren. Ein erneutes Auftauen im Anschluss, einem Vortexen für 30 sek und einer Inkubation der Probe in Eiswasser auf einem Magnetrührer (15 min) folgte ein erneutes Vortexen für 30 sek. Abschließend erfolgte eine Zentrifugation des Probenmaterials bei $17.860 \times g$ für 20 min bei 4°C . Durch diesen Vorgang kommt es zum Entstehen einer lipophilen (oben) und einer lipophoben (unten) Phase im Zentrifugationsgefäß. Durch Nutzung einer Kanüle wurde anschließend die obere Phase abgezogen und

aliquotiert (100 µl), um dann bei -80° C bis zum Vorgang der IEF gelagert zu werden. Ein 20 µl Aliquot wurde zur Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford verwendet.

2.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Ermittlung der identischen Proteinmenge pro Gel bzw. zur Bestimmung des Proteingehalts der einzelnen Homogenate wurde die Methode der Proteinbestimmung nach Bradford angewendet. Hierbei bindet der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue (CBB) G250 an den Proteinkomplex, welches einen Farbumschlag des Protein-Farbstoff-Komplexes zur Folge hat. Dieser Farbumschlag lässt sich anschließend mit Hilfe einer photometrischen Messung (Absorptionsspektrum Maximum der gebundenen (kationischen) roten Form: 465 nm) bestimmen. Durch Komplexbildung mit Proteinen kommt es zu einer Stabilisierung der unprotonierten, anionischen Sulfonatform mit blauer Farbe und das Absorptionsmaximum verschiebt sich auf 595 nm. Diese Verschiebung der Absorption geht einher mit einer direkten Korrelation zu der zu bestimmenden Proteinmenge in der zu untersuchenden Probe. Bevor die Messung des Proteingehalts der einzelnen Proben durchgeführt werden konnte, erfolgte die Erstellung einer Eichkurve. Hierbei wurden Proben mit bekannter, unterschiedlicher Konzentration an BSA (Bovine Serum Albumin) versetzt, um so anhand der sich daraus ergebenden Eichgeraden die jeweilige Proteinkonzentration der Proben zu bestimmen. Der Proteingehalt jedes Homogenats wurde drei Mal aus jeweils drei Einzelansätzen gemessen, um so am Ende den Mittelwert für die Bestimmung des Proteingehalts zu erhalten und für die Durchführung der anschließenden IEF zu nutzen.

2.5 Zweidimensionale Polacrylamid Gelelektrophorese

Bei der 2D-PAGE von Proteinmischungen werden unterschiedliche Proteineigenschaften für die Auftrennung ausgenutzt. In der ersten Dimension werden die Einzelproteine in Abhängigkeit von ihrem pI innerhalb der Probe aufgetrennt. Hierbei wird die Fähigkeit der Proteine ausgenutzt, dass ab einem bestimmten pH-Wert gleich viele Säuregruppen negativ wie Aminogruppen positiv geladen sind. Wird dieser Punkt in einem elektrischen Feld erreicht, verschwindet somit die Beweglichkeit des Proteins und es kommt an dieser Stelle im Medium zum

Erliegen. Der hierfür benötigte pH-Gradient kann über unterschiedliche Weise in das Medium eingebracht werden (beispielsweise über ein im elektrischen Feld mit frei beweglicher Trägerampholyte oder auch über einen immobilisierten Ladungsträger, welcher kovalent mit dem Trägergel verbunden ist). Als Nächstes wird ein elektrisches Feld angelegt, sodass die enthaltenen Proteine einer Probe anhand ihrer Eigenladung soweit im elektrischen Feld wandern, bis diese dem pI entsprechen. Anschließend erfolgt eine Auftrennung in der zweiten Dimension, bei der die in der Probe enthaltenen Proteine anhand ihres Molekulargewichts separiert werden. Hierbei wandern die Proteine mittels einer angelegten Spannung durch ein Polyacrylamidgel. Zudem werden hierbei die zu analysierenden Proteine mit Natriumdodecylsulfat (SDS) versetzt, sodass die enthaltenen Proteine eines Homogenats eine negative Grundladung aufweisen. In Kombination mit einer vorangegangenen Denaturierung der Proteine ist es wiederum möglich, dass sich diese während der Gelelektrophorese anhand ihrer Kettenlänge in Abhängigkeit von der Molekülmasse auftrennen.

2.5.1 Rehydrierung

Hierzu wurden die vorbereiteten Aliquots mit einer Konzentration von 700 μg Protein pro Ansatz auf einen immobilisierten nichtlinearen pH-Gradienten-Streifen (IPG-Streifen) mit einer Länge von 18 cm und einem pH-Bereich von 3-10 geladen. Hierbei wird die Generierung des pH-Gradienten mit Hilfe einer Gelmatrix erreicht, die durch kovalente Bindungen zehn unterschiedliche, fest definierte Acrylamidderivate mit Carboxyl- und Aminogruppenresten beinhaltet. Die Verwendung von nicht-linearen IPG-Streifen wurde deshalb gewählt, da die meisten in den Proben vorhandenen Proteine in einem Bereich von pH 4-7 liegen. Vor dem eigentlichen Prozess der Fokussierung muss eine Rehydrierung der IPG-Streifen erfolgen. Dies ermöglicht den in der Probe vorhandenen Proteinen in den Streifen einzudringen, um so weiter für die PAGE verwendet zu werden. Um dies zu erreichen, werden die Proben mit Rehydrationspuffer versetzt. Hierbei wird das Proben-Puffer Gemisch in die IEF-Kammer gegeben, vermischt und auf dem Kammerboden gleichmäßig verteilt. Nach Zugabe des IPG-Streifens erfolgt eine Beschichtung mit Mineral-Öl, um so eine Austrocknung der Streifen während der Rehydrierung zu verhindern. Die eigentliche Rehydrierung wird bei einer Spannung von 50 V und einer Temperatur von 20° C für 12 Stunden durchgeführt. Nach einer

anschließenden Säuberung der Streifen und der Kammer kann nun der eigentliche Fokussierungsprozess vorgenommen werden. Dafür werden zusätzlich Elektronenwicks zwischen der Elektrode und den Streifen angebracht und die Streifen werden erneut mit Mineralöl überschichtet.

2.5.2 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung

Bei dem Vorgang der IEF ist zu beachten, dass pro Fokussierungsprozess mehrere Proben der Homogenate gleichzeitig fokussiert wurden, um so den Vergleich der einzelnen Proben untereinander so genau wie möglich durchzuführen und Ungenauigkeiten minimieren zu können. Der Fokussierungsprozess teilt sich in folgende Einzelschritte auf: Beginnend mit dem „condition step“, welcher sich in zwei Einzelschritte aufteilt (linearer Spannungsanstieg auf 500 V mit einer Dauer von 30 min, linearer Spannungsanstieg auf 2500 V mit einer Dauer von einer Stunde), folgt als nächstes das sogenannte „slow voltage ramping“ für 2,5 Stunden, bei dem eine Spannung von 8000 V angelegt wird. Anschließend erfolgt das sogenannte „final focussing“, welches den eigentlichen Fokussierungsprozess darstellt und eine Dauer von 50.000 Voltstunden besitzt. Während der gesamten Fokussierung wurde eine konstante Temperatur von 20° C eingehalten. Nach dem Fokussierungsprozess wurden die Proben bei -80° C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.5.3 Zweite Dimension: Polyacrylamid Gelelektrophorese

In der zweiten Dimension erfolgt die Auftrennung der Proteine abhängig von ihrem Molekulargewicht. Hierbei wurden die Proteine vorab mit SDS beladen, welches zu einer Überladung der Eigenladung der Einzelproteine und somit zu einer gesamten Negativladungsverteilung der Proteine innerhalb der Probe führt. Durch den Einsatz von SDS kommt es zu einer gegenseitigen Abstoßung. Dies wiederum erlaubt eine Auftrennung nach der Kettenlänge proportional zur Molekülmasse. Hierbei werden die längeren Proteine im Gel stärker zurückgehalten als kürzere Proteine. Zudem wurde in unserem Fall ein System mit vertikaler Ausrichtung verwendet, da somit eine höhere Reproduzierbarkeit der Proben bei gleichzeitiger Verwendung mehrerer Gele innerhalb eines gleichzeitigen Auftrennungsvorgangs möglich ist.

Vor dem eigentlichen Auftrennungsprozess mit Hilfe der PAGE müssen die IPG-Streifen äquilibriert werden, damit eine Reaktion mit dem Natriumdodecylsulfat

erfolgen kann. Hierfür werden diese zuerst mit dem Äquilibriumspuffer 1 für 45 min und anschließend für 45 min mit dem Äquilibriumspuffer 2 inkubiert, um so Detergentien zu entfernen und Redoxreaktionen von beispielsweise Sulfhydrylgruppen zu verhindern. Anschließend wurden die Streifen auf die vorbereiteten SDS-Gele übertragen. Diese 12% (Tris-HCL)-Polyacrylamid-Gele (200x250x1,5 mm) besitzen die Eigenschaft Proteine mit einer Molekülmasse zwischen 10 und 100 kDa eindeutig zu separieren. Anschließend wurden die Streifen mit Agarose überschichtet, um so eine sichere Fixierung dieser an der Gelmatrix zu gewährleisten. Insgesamt wurden 12 Gele gleichzeitig aufgetrennt, um so eine Vergleichbarkeit der Proben untereinander sicherzustellen und gleiche Versuchsbedingungen für die weitere Analyse zu gewährleisten. Anschließend wurde eine Spannung von 125 V für jedes Gel innerhalb der Gelkammer für durchschnittlich 18 Stunden angelegt, bis sich die Lauffront der Gele ca. 2 cm vor dem anodenständigen Unterrand der Gele befand. Während der Elektrophorese wurde zudem ein Kühlgerät verwendet, damit der eingesetzte Elektrodenpuffer eine konstante Temperatur von 10° C aufweisen konnte.

2.6 Fixierung und Färbung der Gele

Die Fixierung der Gele erfolgte mit Hilfe einer Essigsäure-Methanol-Lösung über Nacht (12 Stunden). Dies hat zum einen zur Folge, dass eine Konservierung der Gele erfolgt, zum anderen können so noch vorhandene Reagenzien, die den Färbeprozess stören würden, entfernt werden.

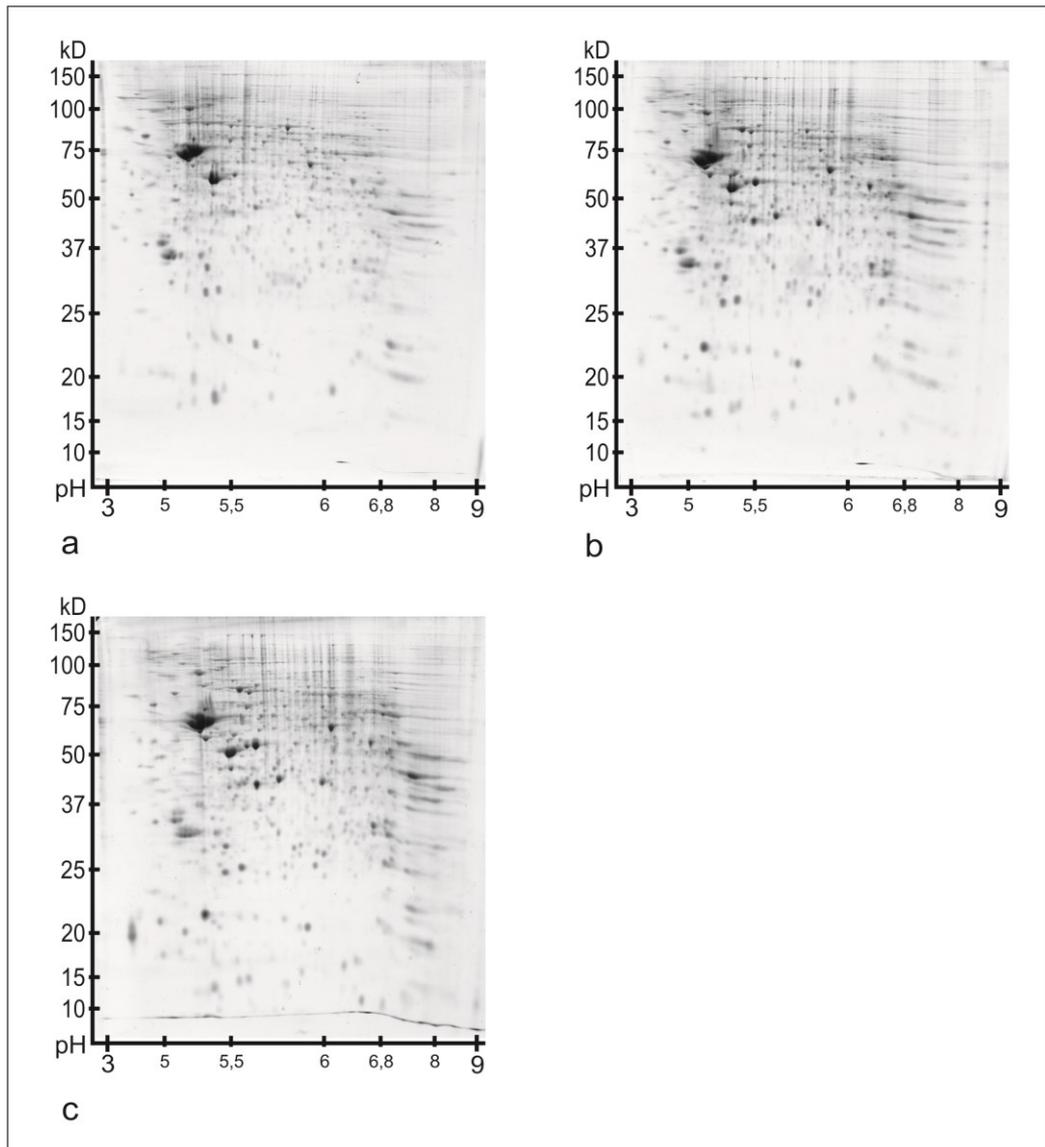


Abbildung 5: Gelfärbung am Beispiel der Referenz-Gele des oB für die Zeitpunkte P7, P90 und P637.

Die Färbung der Gele wurde mit einer CBB G250 Lösung vorgenommen, da diese Lösung die Eigenschaft besitzt alle in einem Gel vorhandenen Proteine visuell sichtbar anzufärben. Der Färbeprozess wurde nach 24 Stunden beendet und die Gele wurden anschließend mit Reinstwasser (bei 4° C) gespült und entfärbt, um am nächsten Tag digital archiviert zu werden.

2.7 Analyse der Einzelgele

2.7.1 Digitalisierung

Die sechs jeweiligen zu einer Gruppe gehörenden Gele wurden mit Hilfe eines fest kalibrierten Scanners aufgenommen. Hierbei wurde mit Hilfe der Software jedes Gel in Graustufen und mit einer Auflösung von 300 dpi eingescannt und archiviert. Anschließend wurden die Gele mit einer 0,02% Natriumazid-Lösung versehen,

eingeschweißt und bei 4° C gelagert. Als nächstes wurde pro Region und Altersgruppe jeweils ein Referenz-Gel ausgewählt, welches als Eigenschaften keine Artefakte, gut abgrenzbare Einzelspots, keine auffälligen Deformationen der Proteinspots und eine gute homogene und kontrastreiche Anfärbung mittels CBB-Färbung aufweisen konnte (Westermeier, 2006). Anschließend wurden die jeweiligen fünf verbleibenden Gele (Template-Gele) pro Gruppe und Altersstufe mit Hilfe der nachfolgenden Gelanalyse den jeweiligen Referenz-Gele zugewiesen.

2.7.2 Digitale Gelanalyse

Für die Auswertung der Gele mittels 2D-PAGE-Bildanalyse wurde die Software Progenesis PG200 Version 2006 verwendet. Als erster Schritt wurden alle sichtbaren Spots identifiziert und manuell mit Hilfe des Programms umrandet/markiert („Spot Editing“, Abb. 6). Dabei wurde vor allem darauf geachtet, dass nur eigentliche Protein-Spots und keine Artefakte in die Markierung aufgenommen wurden.

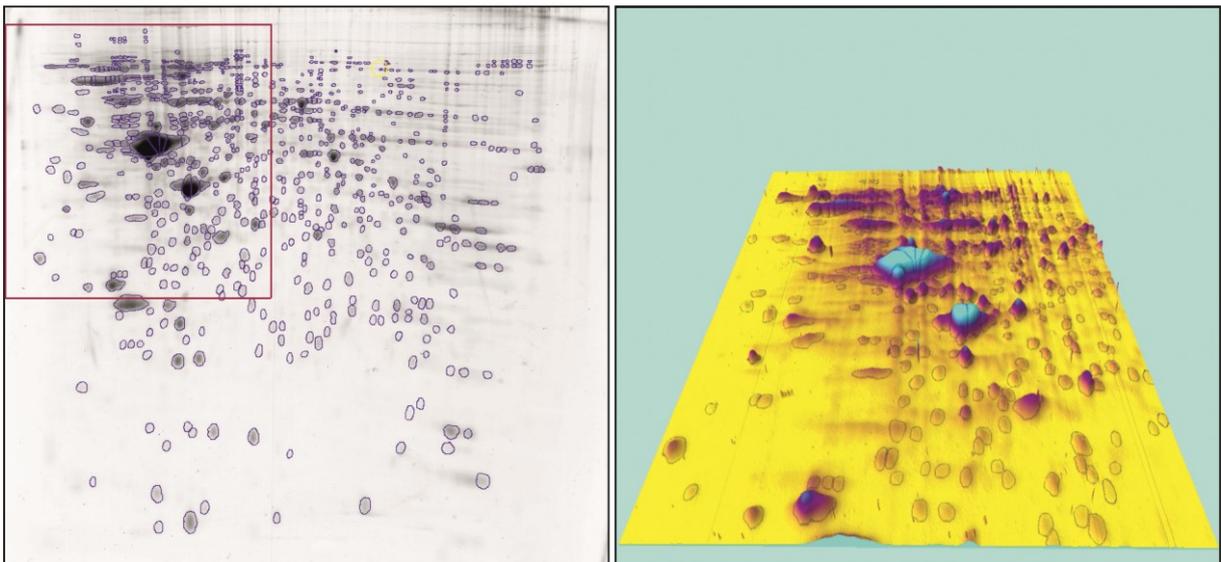


Abbildung 6: Übersicht zur manuellen Spot Segmentierung. Um eine genaue Zuordnung der Spots zu ermöglichen, wurde eine 3D-Visualisierung zur Hilfe gezogen. Dieser Vorgang wurde für alle Template- und Referenz-Gele durchgeführt.

Anschließend wurden die so markierten Spots der einzelnen Template-Gele mit Hilfe des Programms dem Referenz-Gel manuell zugewiesen, sodass die jeweiligen Spots der Template-Gele den gleichen Spots der Referenz-Gele entsprachen („Image-Warping“). Hierbei wurde unter Zuhilfenahme von gewählten Landmarkspots (besonders deutliche Protein-Spots, die in jedem der sechs Gele pro Fraktion vorhanden sind) die Zuordnung vorgenommen.

2.7.3 Bestimmung der Proteine/Spots für die weitere Analyse

Unter Zuhilfenahme der jeweiligen Fläche eines Spots und der dazugehörigen Grauwert-Intensität lässt sich das Spotvolumen mit Hilfe des Spotvolumenkoeffizienten (SVQ) berechnen und eine anschließende Normierung gegenüber allen vorhandenen Spots des Gels vornehmen (P90/P7 oder P90/P637). Hierbei wurde darauf geachtet, dass in mindestens vier der sechs Gele der jeweilige korrelierte Spot vorhanden war. Zusätzlich wurde mit Hilfe des Koeffizienten die Hoch- bzw. Herunterregulation des jeweiligen Proteins bestimmt.

2.7.4 Bestimmung differentiell exprimierter und abundant ausgebildeter Proteine

Sobald der SVQ eines Spots einen Wert von $\leq 0,6$ zeigte, wurde dies als eine Hochregulation gewertet, bei einem Wert von $SVQ \geq 1,67$ hingegen als eine Herunterregulation gegenüber P90. Alle Spots, die diese Eigenschaften aufwiesen wurden als signifikant differentiell reguliert bewertet und somit für die massenspektrometrische Analyse weiter vorbereitet. Wenn nach der Analyse in einem Gel von einem Protein mehrere unterschiedliche Spots gefunden wurden oder dessen Expression nicht eindeutig war (Protein lag mit einem weiteren Protein in einem „mixed Spot“ vor), wurde dies zusätzlich markiert und nicht für die weitere Analyse verwendet (siehe Anhang, Tab. A1 (a-d)). Die Klassifizierung der unterschiedlich exprimierten Proteine und der sich daraus ergebenden Proteingruppierungen wurde durch einen Vergleich der unterschiedlichen Proteineigenschaften erstellt (unter Zuhilfenahme der Protein-Datenbanken: Entrez Gene, GeneCards, UniProtKB/Swiss-Prot, und/oder UniProtKB/TrEMBL).

2.7.5 Statistik

Exemplarisch wurden die Daten der Analyse der unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkte des Ce für eine statistische Überprüfung der Daten genutzt. Hierfür wurde anstatt der Anwendung einer parametrischen oder nicht-parametrischen statistischen Auswertung das „Mehrbedingungs-Überdeckungsverfahren“ („multi condition coverage method“) verwendet, wobei die erste Bedingung besagt, ob eine Veränderung zwischen $SVQ \leq 0,67$ oder $SVQ \geq 1,67$ besteht, sowie ob für die zweite Bedingung Veränderungen in vier der sechs Gele stattfinden. Zusätzlich wurde der nichtparametrische „Mann-Whitney U-Test“

durchgeführt. Die hieraus resultierenden Ergebnisse für die einzelnen differentiell exprimierten Proteine des Ce sind im Anhang (Tab. A1 (d)) aufgeführt.

2.8 Spotidentifikation

Die jeweiligen Arbeiten der Spotidentifizierung wurden im Proteom-Zentrum Rostock, Abteilung für Proteomforschung (Leitung: Prof. Dr. Michael Glocker) im Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Rostock mit Hilfe von Herrn Dr. Stefan Mikkat und Herrn Michael Kreutzer durchgeführt und nach vorgegebenen Protokollen (Konus et al., 2013) weiter verarbeitet.

2.8.1 Spot Picking

Zunächst wurden die noch in der Natriumazid-Lösung gelagerten Gele mit Reinstwasser gespült und unter Zuhilfenahme einer Schablone im Spot-Picker positioniert. Anschließend wurde mit einer im Picker integrierten Kamera ein Übersichtsbild des Gels erstellt, um so die aufgenommenen Spotkoordinaten mit denen der in Programm Progenesis PG200 erstellten Proteinspots in Beziehung zu setzen. Darauffolgend wurden die als differentiell reguliert ausgewählten Spots mit einem Durchmesser von 1,2 mm ausgestochen und in spezielle 96er Wellplatten überführt.

2.8.2 Tryptische in-Gel Verdauung

Für die enzymatische Verdauung der ausgestochenen Spots wurde zunächst eine Entfärbung (unter Verwendung von Ammoniumhydrogencarbonat) der einzelnen Gelstücke („Gelplugs“) vorgenommen. Anschließend wurden die Proben für jeweils 20 min mit Waschlösung 1, Waschlösung 2 und zuletzt mit reinem ACN (100%) versehen, wobei nach jedem Vorgang eine Zentrifugation (Dauer: 1 min, 1000 rpm, 22° C) durchgeführt wurde, um so die jeweiligen Lösungen zu entfernen. Danach erfolgte eine Inkubation der entfärbten und dehydrierten Gelplugs im Brutschrank bei 37° C zum Trocknen. Als nächstes wurden die Gelstücke mit einer Trypsinlösung versehen und für acht Stunden bei 37° C inkubiert. Abschließend wurden unter der Zugabe von 5 µl Extraktionslösung und einer darauffolgenden Zentrifugation (4000 rpm, 22° C, 5 min) die Peptid-Fragmente extrahiert und in neue 96-Well-Platten überführt.

2.8.3 Massenspektrometrische Analyse

Für die Identifikation der Proteine wurde die MALDI-Technik (Ionisierung der Probenmoleküle gemäß der Matrix gestützten Laserdesorptions-/Ionisation) genutzt, da diese den Vorteil bietet, dass eine höhere Toleranz gegenüber Verunreinigungen (Detergenzien, Salze) gegeben ist (Domon und Aebersold, 2006). Die Auftragung der Peptidfragmente erfolgte unter Verwendung der α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure Matrix auf einen 384/600 μm AnchorChip, wobei jede Targetposition nach dem Trocknen mit 0,1% Trifluoressigsäure (und einem nach 30 sek anschließenden Abziehen der Lösung mit einem Filterpapier) gewaschen wurde. Die MALDI-Analyse wurde mit Hilfe eines 4700 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF Massenspektrometers durchgeführt, wobei alle massenspektrometrischen Daten der Proben mit Hilfe der 4700 Explore™ Software weiter analysiert wurden. Für die jeweilige Proteinanalyse wurden die jeweiligen Spektren an MASCOT (Version 2.4.0) mit Hilfe des MASCOT Daemon übermittelt. Die Suche wurde hierbei gegen Datenbankeinträge der Teilgruppe von Rattenproteinen durchgeführt (2012_01; 42755 sequences from Rattus). Als Massentoleranz wurde hierbei 60 ppm mit einer fehlenden Spaltungsstelle gewählt, wobei eine Oxidation von Methionin-Resten eine variable Modifikation und die Carbamidomethylierung von Cysteinen eine feste Modifikation darstellte. Die jeweiligen Peptidmassen von Autoproteolyse-Produkten des Trypsins und Signale, ausgelöst durch die Matrix, wurden in der Messung nicht berücksichtigt. Bei einer Identifikation wurden die Proben als signifikant angesehen, welche einen Mascot Score größer als 59 ($p < 0,05$) aufwiesen. Die Identifikation der Proteine anhand der erhaltenen Spektren erfolgte durch den Abgleich mit den theoretischen Spektren der SWALL-Datenbank (Swiss Prot und TrEMBL (Translated European Molecular Biology Laboratory)). Insgesamt wurde auf das Vorhandensein von multiplen Proteinen innerhalb einer Probe sowie auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse geachtet.

2.9 Western Blot Analyse

Hierbei wurden exemplarisch ausgewählte Protein-Proben der unterschiedlichen Altersstufen des oB einer Western Blot Analyse unterzogen, um so eine exemplarische Ergebnisvalidierung der massenspektrometrischen Analyse einzelner differentiell regulierter Proteine vorzunehmen. Hierfür wurden die homogenisierten Proteinproben mit Probenpuffer versehen und anschließend für 10 min gekocht. Der Proteingehalt der einzelnen Proben wurde anschließend mit Hilfe der Neuhoff-Proteinbestimmung (Neuhoff et al., 1979) ermittelt.

2.9.1 Durchführung der SDS-PAGE

Nachdem eine gründliche Reinigung des kompletten Elektrophoresesystems mit Ethanol und Aqua bidest erfolgt ist, wurden 7,5% Polyacryamid Gele verwendet und die Kammer wurde mit Laufpuffer (1x) aufgefüllt, sodass der Stromkreis geschlossen vorliegt. Die Taschen des Gels wurden nun mit den aufzutrennenden Proben und dem Molekulargewichts-Standard versehen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben nach ihrem Molekulargewicht erfolgte für 1 Stunde bei konstanter Spannung von 160 V.

2.9.2 ECL-Western Blot (Tank Blotting)

Bei diesem Verfahren wurden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran transferiert. Hierbei wandern die aufgetrennten Proteine im elektrischen Feld zur Anode und werden auf der PVDF-Membran immobilisiert. Anschließend können die Proteine immunochemisch, mit Hilfe der Bindung spezifischer Antikörper, nachgewiesen werden. Nach der erfolgreichen Gelelektrophorese wurde das Gel der Apparatur entnommen und für 5 min in Transferpuffer gewaschen, sodass überflüssige Laufpuffersalze entfernt wurden. Des Weiteren wurden auch die Schwämme, Filterpapier und die PVDF-Membran vor Versuchsbeginn in Transferpuffer eingeweicht. Damit ein vollständiger Transfer der Proteine vom Gel zur PVDF-Membran gewährleistet ist, muss die Blotkassette luftfrei zusammengebaut werden. Begonnen wird in Kathodenrichtung mit einem Schaumstoffschwamm und zwei Filterpapieren, danach wird das Gel eingebaut und mit einer PVDF-Membran bedeckt. Anschließend werden wieder zwei

Filterpapiere und ein Schaumstoffschwamm in Richtung Anode auf die Membran gelegt und mit Hilfe der Kassette fixiert (Abb. 7).

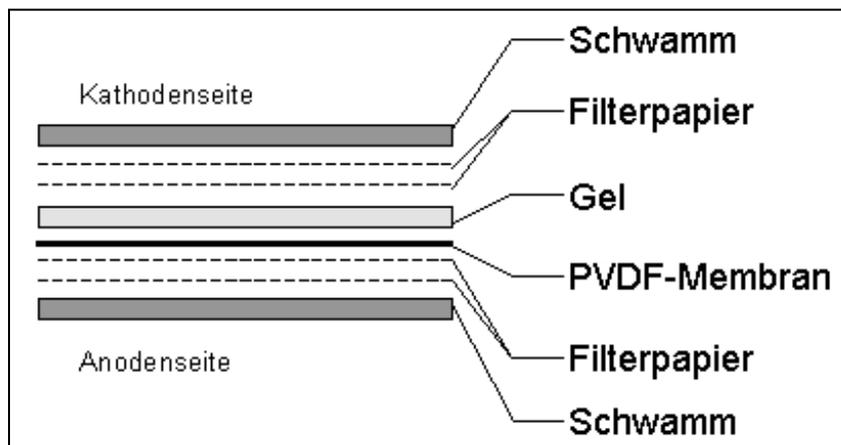


Abbildung 7: Zusammensetzung der Blotkassette.

Die zusammengebaute Kassette kann nun mit einem Kühlakku in die Transferkammer gegeben werden. Anschließend wurde diese mit Transferpuffer aufgefüllt und bei einer konstanten Stromstärke von 350 mA für 1 Stunde erfolgte der Transfer der Proteine.

2.9.3 Immunochemischer Nachweis von Proteinen mittels ECL

Der immunochemische Nachweis von Proteinen beruht auf dem Einsatz von primären Antikörpern, die an die zu detektierenden Proteine binden. Die sekundären Antikörper, welche mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) konjugiert sind, binden an die primären Antikörper. Wird die PVDF-Membran anschließend mit einer Reaktionslösung überspült, katalysiert HRP eine Reaktion, welche Lumineszenzlicht erzeugt. Dieses kann durch Auflegen eines Röntgenfilms auf die Membran als Schwärzung detektiert werden. Die verwendeten primären Antikörper wurden in 5 ml Blockpuffer mit 0,1% Natriumazid verdünnt. Das Natriumazid gewährleistet hierbei eine längere Haltbarkeit der Lösung. Die sekundären Antikörper wurden immer frisch direkt vor Gebrauch in Blockpuffer angesetzt und nach Gebrauch verworfen. Damit es zu keiner unspezifischen Bindung des Antikörpers kommt, wurde die Membran für 30 min mit Blockpuffer gewaschen. Anschließend konnte die Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4° C unter Schwenken erfolgen. Danach wurde die Membran dreimal für jeweils 15 min mit TBST gewaschen, bevor dann der sekundäre Antikörper bei

Raumtemperatur appliziert wurde. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde die Membran erneut dreimal für jeweils 15 min mit TBST gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit je 500 µl der Reaktionslösungen des ECL-Detektkits für circa eine Minute überspült, zwischen eine Klarsichtfolie eingebettet und in eine Röntgenplatte eingeklebt. Danach wurde sie im Dunkelraum mit einem Röntgenfilm beschichtet. Der Röntgenfilm wurde je nach Menge des zu detektierenden Proteins unterschiedlich lange belichtet. Dann erfolgte die Inkubation in einem Entwicklerbad und die Reaktion wurde in einem Stoppbad beendet, worauf eine Konservierung des Films in einem Fixierbad erfolgte. Abschließend wurde der Film noch einmal mit Aqua bidest gewaschen, um Reste des Fixierers zu entfernen. Schließlich wurden die durch das emittierte Licht geschwärzten Bereiche des Films ausgewertet.

3. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Aspekte der 2D-PAGE nach Fixierung und Färbung, der Spotzuordnung und Identifikation, des differentiellen Proteoms sowie die Unterschiede in den Spotzahlen und der Proteinverteilung pro Region und Zeitpunkt dargestellt. Die Abfolge gleicht hierbei dem beschriebenen Ablauf im Material und Methoden Kapitel.

3.1 Ergebnisse der 2D-PAGE nach Fixierung und Färbung

Nachdem die Gele fixiert und gefärbt wurden, ist ein charakteristisches Spotmuster in den einzelnen Gelen zu erkennen. Auffällig hierbei sind vor allem die deutlich sichtbaren Spots im Bereich um 50 kDa (pH 4-4,5). Außerdem kann in allen hier präsentierten Gelen eine Abnahme der Spotdichte im niedermolekularen Bereich (40-10 kDa) sowie des Weiteren im basischen Bereich (pH 6,5-10) beobachtet werden.

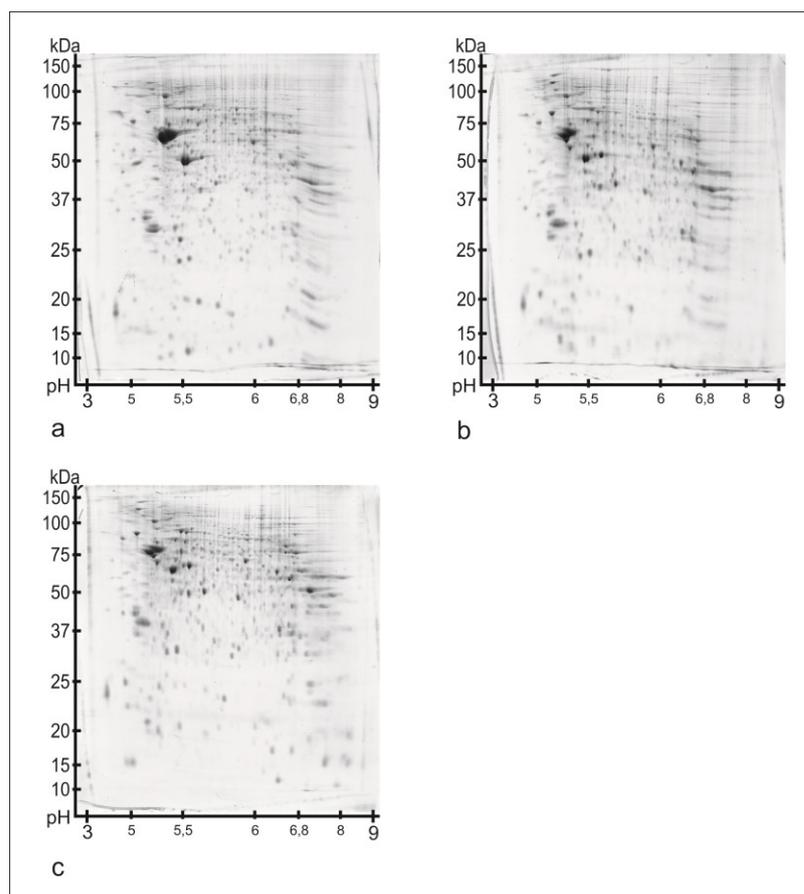


Abbildung 8: Referenz-Gele der untersuchten Regionen am Beispiel des Ce zu den unterschiedlichen Zeitpunkten P7 (a) , P90 (b) und P637 (c) nach Fixierung und Färbung. Die x-Achse beschreibt hierbei den pH-Wert, die y-Achse gibt das Massengewicht der visualisierten Spots in kDa an.

3.2 Ergebnisse der Spotzuordnung

In den folgenden Tabellen (Tab. 1, 2, 3) sind die jeweiligen Spotanzahlen pro Gel in den unterschiedlichen Regionen zu den verschiedenen Zeitpunkten aufgeführt.

Tabelle 1: Übersicht der differentiellen Spotanzahl pro Einzelgel (Referenz-Gel und Template-Gele) zu den Zeitpunkten P7, P90, P637 im oB. Die Referenz-Gele sind jeweils markiert.

[oB P7] Gel Strip iD	Spotanzahl	[oB P90] Gel Strip iD	Spotanzahl	[oB P637] Gel Strip iD	Spotanzahl
61833	752	61916	732	68014	761
61834	726	61917	644	68015	714
61835	874	61918	695	68016	797
61836	891	61919	1063	68017	819
61837	849	61920	813	68018	872
61915	877	61921	700	68019	748

Tabelle 2: Übersicht der differentiellen Spotanzahl pro Einzelgel (Referenz-Gel und Template-Gele) zu den Zeitpunkten P7, P90, P637 im Ce. Die Referenz-Gele sind jeweils markiert.

[Ce P7] Gel Strip iD	Spotanzahl	[Ce P7 P90] Gel Strip iD	Spotanzahl	[Ce P7 P637] Gel Strip iD	Spotanzahl
67391	1023	68020	476	76683	754
67392	864	68021	694	76684	596
68026	878	68022	781	76685	750
68027	928	68023	662	76686	675
68028	911	68024	660	76687	879
68029	807	68025	551	76688	1001

Tabelle 3: Übersicht der differentiellen Spotanzahl pro Einzelgel (Referenz-Gel und Template-Gele) zu den Zeitpunkten P7, P90, P637 im Co. Die Referenz-Gele sind jeweils markiert.

[Co P7] Gel Strip iD	Spotanzahl	[Co P90] Gel Strip iD	Spotanzahl	[Co P637] Gel Strip iD	Spotanzahl
61070	759	61064	779	79383	469
61071	664	61065	747	79384	541
61072	753	61066	689	79385	466
61073	832	61067	779	79386	407
61074	708	61068	728	79387	488
61075	726	61069	655	79388	488

Anschließend gibt die nachfolgende Tabelle (Tab. 4) die Anzahl an Spots wieder, die in mindestens vier der sechs Gele pro Region und Altersstufe vorhanden waren. Zudem wiesen diese Spots einen SVQ auf, der entweder $\geq 1,67$ bzw. $\leq 0,6$ ist und somit diese Spots als differentiell exprimiert gegenüber dem Vergleichsgel (P90) der jeweiligen Region betrachtet wurden. Ein Vergleich der einzelnen Altersstufen (P7, P637) mit der mittleren, noch verbleibenden Altersstufe (P90) erfolgte, um so vorhandene Expressionsunterschiede festzustellen. Sobald ein einzelnes Protein

innerhalb eines Spots eindeutig analysiert werden konnte, wurde dieses als hochreguliert („up-regulated“, up) bewertet. Wurde hingegen eine geringere Expression eines Proteins innerhalb eines Spots in den Altersstufen gegenüber P90 gemessen, so erhielt dieses eine Kennzeichnung als herunterreguliert („down-regulated“, down). Zudem konnten Proteine analysiert werden, die im direkten Vergleich zu P90 nur innerhalb einer einzelnen Altersstufe aufgefunden werden konnten. Im Weiteren wurden sie als nicht nachgewiesen („absent“ in mindestens vier der sechs Gele) für die jeweilige Altersstufe gekennzeichnet. Die Spots wurden demnach für die weitere massenspektrometrische Analyse (MALDI-TOF) genutzt.

Tabelle 4: Übersicht der analysierten Spotanzahl pro Einzelgel und Region zu den Zeitpunkten P7, P90 und P637.

Region	SVQ $\leq 0,6$	SVQ $\geq 1,67$	absent P7	absent P90	absent P637
oB	67 [P7] + 16 [P637]	61[P7] + 18 [P637]	12	26	6
Ce	50 [P7] + 24 [P637]	79 [P7] + 34 [P637]	28	4	2
Co	27 [P7] + 21 [P637]	61 [P7] + 15 [P637]	16	48	3

Die hier aufgeführten Spots wurden mit Hilfe eines Spotpickers aus dem Gel herausgelöst, um dann weiter verarbeitet zu werden.

3.3 Ergebnisse der Spotidentifikation

In der folgenden Tabelle (Tab. 5) ist die Anzahl an Proteinen wiedergegeben, die in der jeweiligen Region insgesamt analysiert werden konnte.

Tabelle 5: Gesamtmenge an analysierten Proteinen pro Region.

Region	oB	Ce	Co
Gesamtmenge an analysierten Proteinen	160	164	113

Wenn nach der Analyse in einem Gel von einem Protein mehrere unterschiedliche Spots gefunden wurden oder dessen Expression nicht eindeutig war, wurden diese zusätzlich markiert und nicht für die weitere Analyse verwendet (siehe Tab. A1(a-d), Anhang). Die analysierten Spots wurden als nächstes mit Hilfe von Protein-Datenbanken (Entrez Gene, GeneCards, UniProtKB/Swiss-Prot, und/oder UniProtKB/TrEMBL) verglichen, um so deren funktionelle Klassifikation sowie die zelluläre Lokalisation der einzelnen Proteine anhand ihrer Eigenschaften zuzuordnen. Die jeweiligen Kennzeichnungen bezüglich der zellulären Lokalisation sind im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt.

3.4 Ergebnisse der Proteinidentifikation

Wie schon vorab beschrieben, wurde für die Proteinauftrennung der einzelnen Regionen und verschiedenen Altersstufen (P7, P90, P637) die 2D-PAGE Methode angewendet, um darauffolgend mit Hilfe von „Gel-matching“, „Spot-warping“ und differentieller Spotanalyse kombiniert mit einer Proteinidentifikation (MALDI-TOF) die Unterschiede in der Proteinexpression festzustellen. Ferner wurden die differentiell exprimierten Proteine in 13 funktionelle Proteingruppen eingeteilt.

Im nächsten Abschnitt wird nun jeweils auf die Hoch- bzw. Herunterregulation der einzelnen Proteingruppen innerhalb einer Altersstufe (P7, P637) im Bezug zu der Vergleichsaltersstufe (P90) für die unterschiedlichen analysierten Gehirnregionen der Ratte (oB, Ce, Co) eingegangen und diese beschrieben. Die spezifischen differentiell exprimierten Proteine werden in den Tabellen (Tab. 7, 9, 11) genauer bezeichnet, aber im folgenden Text zunächst nur quantitativ beschrieben.

3.4.1 Ergebnisse der Proteinidentifikation im oB

Innerhalb des oB sind zum Zeitpunkt P7 gegenüber P90 insgesamt 126 Proteine differentiell exprimiert, wobei hiervon 61 Proteine gegenüber P90 hochreguliert und 50 Proteine herunterreguliert sind. Neun Proteine wurden nicht in P7 gefunden (absent), d.h. diese sind nur in P90 vorhanden. Außerdem sind insgesamt sechs Proteine innerhalb des oB in P637 vorhanden, nicht aber in P90 (Tab. 6).

Tabelle 6: Übersicht der differentiellen Expression der Proteine des oB in P7 und P637 im Vergleich zu P90.

Kategorie	Menge [P7] (absolute Werte)	Menge [P637] (absolute Werte)
Insgesamt	126	43
Hochregulation	61	21
Herunterregulation	50	14
absent	9	4
absent P90	6	4

Beginnend mit den funktionellen Proteinklassen, welche die höchste differentielle Proteinexpression aufweisen, konnte innerhalb von P7 festgestellt werden, dass hier vor allem die Proteine des Kohlenhydratmetabolismus (18% Gesamtanteil, siehe Abb. 9) am häufigsten vertreten sind. Innerhalb dieser Gruppe konnten 14 Proteine

ermittelt werden, die gegenüber P90 herunterreguliert sind. Eine Anzahl von fünf Proteinen ist zudem im Vergleich mit P90 hochreguliert. Ferner konnte festgestellt werden, dass vier Proteine dieser Kategorie nur innerhalb von P90, nicht aber in P7 (P7 absent) gebildet werden (Abb. 10).

Die Gruppe mit der nächsthöheren Anzahl an differentiell exprimierten Proteinen innerhalb dieser Entwicklungsstufe stellen die Proteine dar, welche in Prozesse der Biosynthese involviert sind (17% Gesamtanteil). Hierbei konnte festgestellt werden, dass insgesamt eine Hochregulation an Proteinen gegenüber P90 gegeben ist. Eine Anzahl von 13 Proteinen ist hierbei hochreguliert, wobei vier Proteine als herunterreguliert analysiert werden konnten. Zudem konnte ein Protein in P7 und drei Proteine in P90 als absent bestimmt werden.

Die Strukturproteine, welche für die dynamische Organisation des Zytoskeletts der Zelle zuständig sind (11% Gesamtanteil), zeigten insgesamt eine höhere Anzahl an hochregulierten Proteinen (zehn Proteine) gegenüber den herunterregulierten Proteinen (drei Proteine). Außerdem konnte ein Protein analysiert werden, welches nur in P7, nicht aber in P90 vorhanden ist.

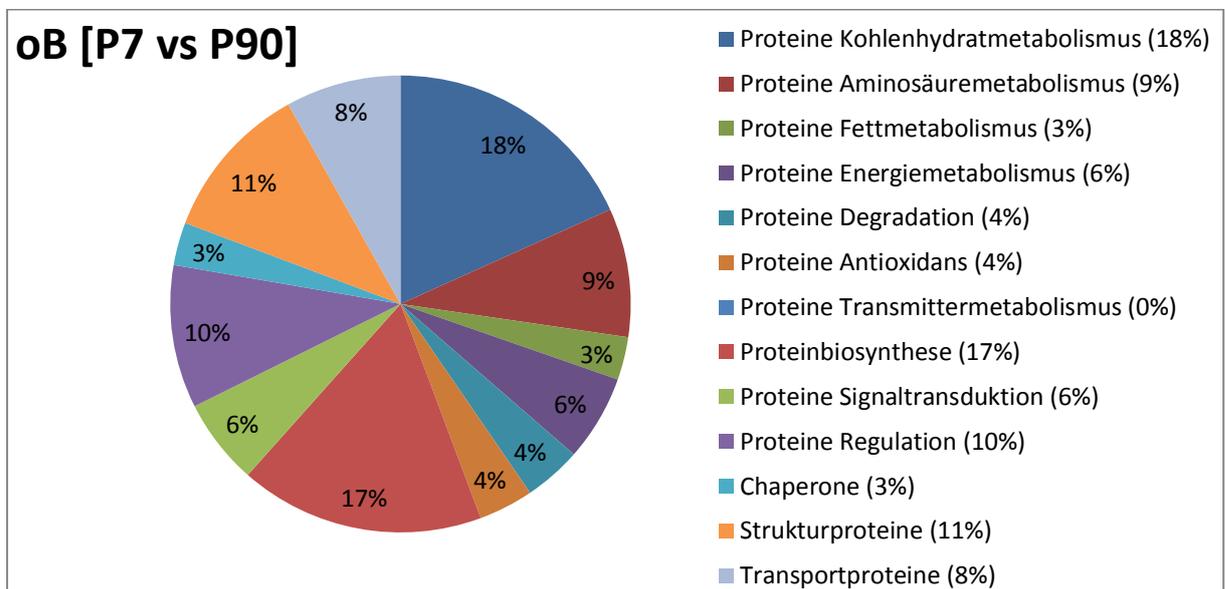


Abbildung 9: Relative Häufigkeit der differentiell exprimierten Proteine innerhalb des oB [P7 vs P90].

Auch in den verbleibenden Kategorien konnten Unterschiede im Vergleich von P7 und P90 festgestellt werden. So zeigen die Proteine, welche in regulatorische Prozesse eingebunden sind (10% Gesamtanteil, acht hochregulierte Proteine und vier herunterregulierte Proteine, ein Protein ist absent in P7), die Proteine des

Aminosäuremetabolismus (9% Gesamtanteil, zwei hochregulierte Proteine und sieben herunterregulierte Proteine, zwei Proteine sind absent in P7) sowie die Transportproteine (8% Gesamtanteil, sechs hochregulierte Proteine und drei herunterregulierte Proteine, ein Protein ist absent in P90) Unterschiede in der differentiellen Expression.

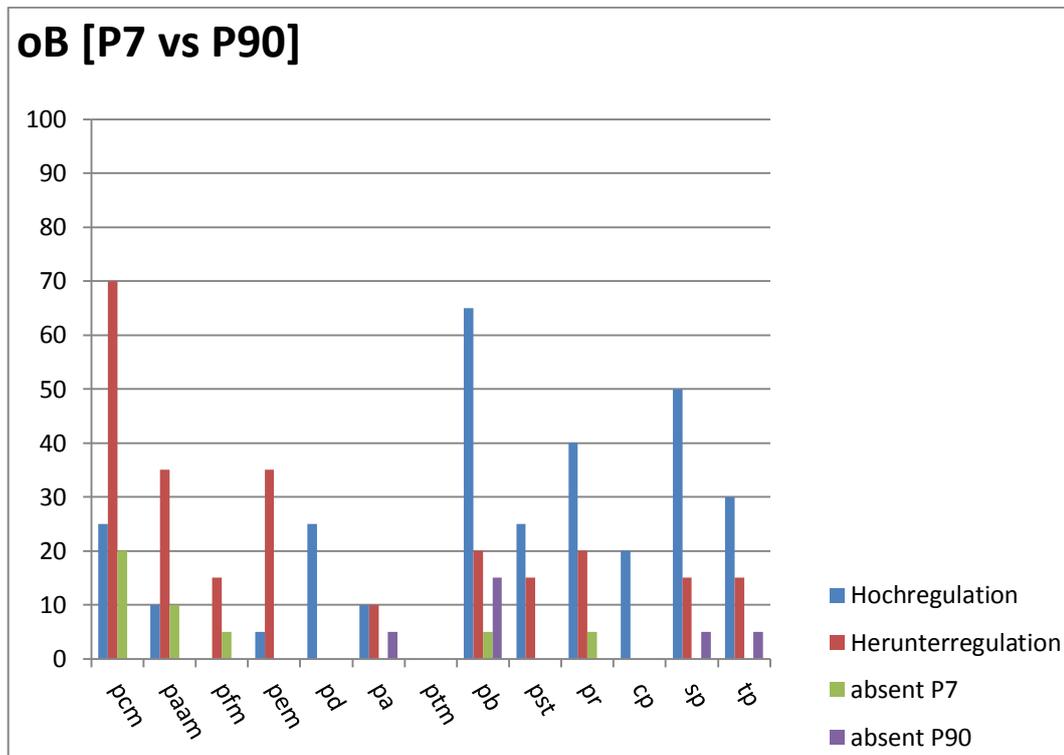


Abbildung 10: Anzahl an differenziell exprimierten Proteinen der unterschiedlichen Proteinkategorien innerhalb des oB [P7 vs P90] (20 = 100%). ((Abkürzungen für Abb. 10, Abb. 12, Abb. 14, Abb. 16, Abb. 18, Abb. 20): pcm: Proteine des Kohlenhydratmetabolismus; paam: Proteine des Aminosäuremetabolismus; pfm: Proteine des Fettmetabolismus; pem: Proteine des Energiemetabolismus; pd: Degratorische Proteine; pa: Proteine mit antioxidantischer Wirkungsweise; ptm: Proteine des Transmittermetabolismus; pb: Proteine der Biosynthese; pst: Proteine der Signaltransduktion; pr: regulatorische Proteine; cp: Chaperone; sp: Strukturproteine; tp: Transportproteine. Die Anzahl an hochregulierten Proteinen pro Kategorie ist in blau gezeigt, herunterregulierte Proteine in rot, absent Proteine in P7/P637 sind in grün und in P90 in violett dargestellt.)

Außerdem zeigen auch die funktionellen Proteingruppen, welche in den Energiemetabolismus eingebunden sind (6% Gesamtanteil, sieben herunterregulierte Proteine und ein hochreguliertes Protein), Proteine der Signaltransduktion (6% Gesamtanteil, fünf hochregulierte Proteine, drei herunterregulierte Proteine), Proteine mit degradierender Wirkungsweise (4% Gesamtanteil, insgesamt fünf hochregulierte Proteine), Proteine mit Antioxidanseigenschaften (4% Gesamtanteil, zwei hochregulierte sowie zwei herunterregulierte Proteine, ein Protein ist absent in P90), Chaperone (3% Gesamtanteil, vier hochregulierte Proteine) sowie Proteine des Fettmetabolismus (3% Gesamtanteil, drei herunterregulierte Proteine, ein Protein

absent in P7) eine differentielle Regulation für diese Entwicklungsstufe. Lediglich die Proteine, welche in den Transmittermetabolismus involviert sind, zeigen innerhalb des Vergleichs dieser Entwicklungsstufen keine differentiellen Unterschiede.

Auch im Vergleich von der Altersstufe P637 mit P90 konnten Unterschiede in der Expression von Proteinen innerhalb der einzelnen funktionellen Proteingruppen analysiert werden.

So konnte zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zu P90 festgestellt werden, dass eine Anzahl von insgesamt 43 Proteinen innerhalb dieser Entwicklungsstufe eine differentielle Expression gegenüber P90 zeigt. Eine Hochregulation konnte bei 21 Proteinen festgestellt werden, hingegen sind 14 Proteine herunterreguliert. Zudem konnte herausgefunden werden, dass jeweils vier Proteine in P7 wie auch in P90 als „absent“ vorliegen (Tab. 6).

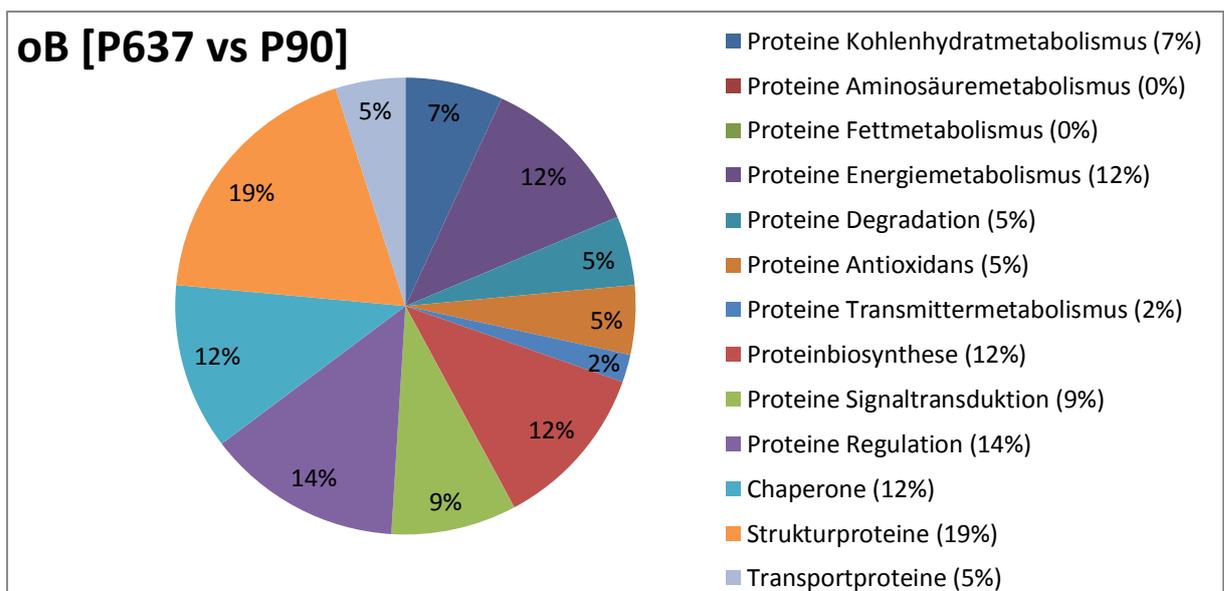


Abbildung 11: Relative Häufigkeit der differentiell exprimierten Proteine innerhalb des oB [P637 vs P90].

Innerhalb dieser Entwicklungsstufe ist die Gruppe der Strukturproteine (Gesamtanteil: 19%, Abb. 11) mit einer Anzahl von sechs hochregulierten Proteinen gegenüber P90 am höchsten differentiell reguliert. Zudem konnten zwei Proteine analysiert werden, welche stärker in P90 im Vergleich zu P637 exprimiert (herunterreguliert) sind (Abb. 12).

Bezüglich der funktionellen Proteinklasse mit der nächst höheren differentiellen Expression innerhalb dieser Entwicklungsstufe zeigen die Proteine, welche in regulatorische Prozesse involviert sind (14% Gesamtanteil) eine Anzahl von zwei hochregulierten Proteinen. Zudem konnten zwei Proteine ermittelt werden, welche

gegenüber P90 herunterreguliert vorliegen, sowie ein Protein welches nur in P90 zu finden war und somit in P637 als absent zu bewerten ist. Ein Protein ist absent in P90.

Innerhalb der funktionellen Gruppe der Proteine, welche in Vorgänge der Biosynthese involviert sind (12% Gesamtanteil) zeigt sich, dass eine Anzahl von vier Proteinen eine Hochregulation gegenüber P90 erfahren hat. Außerdem konnte ein Protein ermittelt werden, welches nur in P90 vorzufinden war und somit in P637 als absent vorliegt.

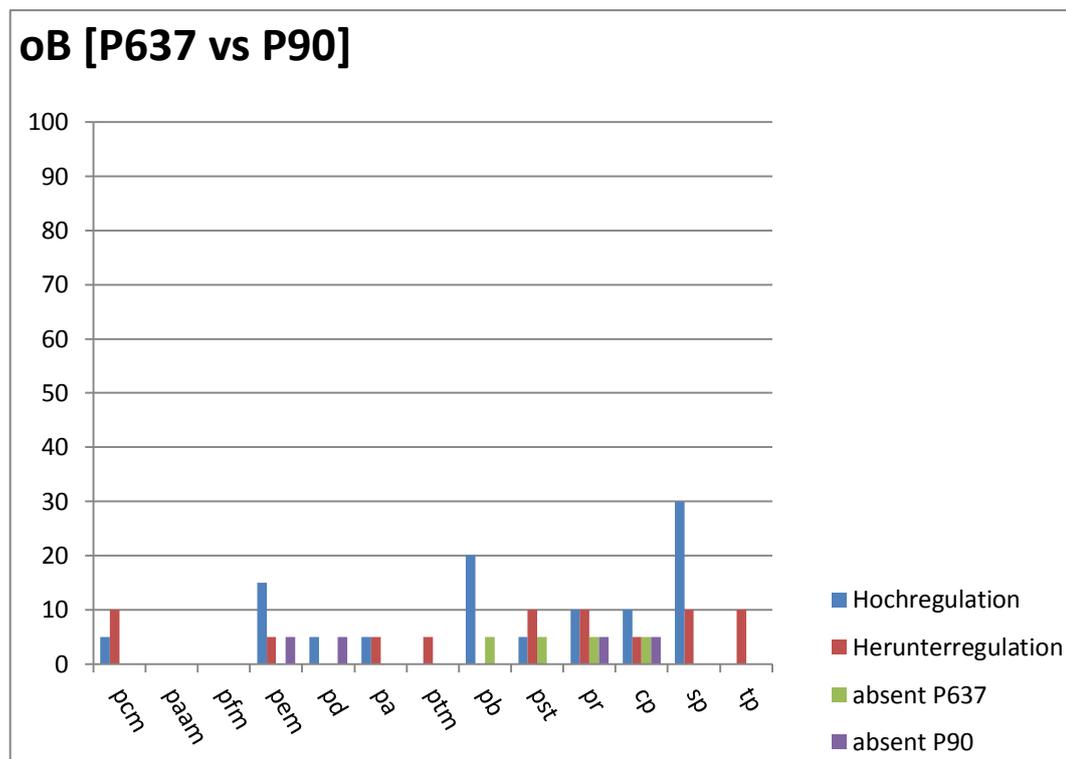


Abbildung 12: Anzahl an differenziell exprimierten Proteinen der unterschiedlichen Proteinkategorien innerhalb des oB [P637 vs P90] (20 = 100%).

Ferner konnte analysiert werden, dass es auch in den übrigen Kategorien der Entwicklungsstufe P637 im Vergleich zu P90 zu Unterschieden in der Expression von Proteinen gekommen ist. So konnte bei den Chaperonen (12% Gesamtanteil, zwei hochregulierte Proteine, ein herunterreguliertes Protein, ein Protein absent in P90 sowie in P637), Proteinen des Energiemetabolismus (12% Gesamtanteil, drei hochregulierte Proteine, ein herunterreguliertes Protein sowie ein absent Protein in P90), den Proteinen, welche in Vorgängen der Signaltransduktion involviert sind (9% Gesamtanteil, ein hochreguliertes Protein, zwei herunterregulierte Proteine sowie ein absent Protein in P637), Proteinen des Kohlenstoffmetabolismus (7% Gesamtanteil, ein hochreguliertes Protein und zwei herunterregulierte Proteine), Transportproteinen

(5% Gesamtanteil, zwei herunterregulierte Proteine), Proteinen der Degradation (5% Gesamtanteil, ein hochreguliertes Protein sowie ein absent Protein zum Zeitpunkt P90) Unterschiede gefunden werden. Außerdem konnte in der funktionellen Proteinklasse der Proteine mit Antioxidanseigenschaften (Gesamtanteil: 5%) ein hoch- sowie ein herunterreguliertes Protein detektiert werden. Zudem konnte ein herunterreguliertes Protein, eingebunden in den Transmittermetabolismus, identifiziert werden (Gesamtanteil: 2%). Die Proteine, welche am Fett- sowie am Aminosäuremetabolismus beteiligt sind, zeigten innerhalb dieser Entwicklungsstufe keine Unterschiede in der Expression im Vergleich mit dem Zeitpunkt P90 (Tab. 7).

Tabelle 7: Ergebnistabelle der identifizierten Proteine durch Peptide Mass Fingerprinting der Coomassie gefärbten Gele des oB. Die Einordnung entspricht der jeweiligen funktionellen Klasse des Proteins. Accession: Accession Nummer (UniProtKB/Swiss-Prot); Entry name: Entry name (UniProtKB/Swiss-Prot); Gene name: von UniProtKB/Swiss-Prot; analysierte Proteine, welche eine differentielle Expression innerhalb beider Entwicklungszeitpunkte zeigten, sind nebeneinander aufgeführt (Regulation [P7]/Regulation [P637]); zell. Lokalisation: Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle (siehe Abkürzungsverzeichnis).

Accession	Entry name	Gene name	Funkt. Gruppe/Protein Name	Regulation [P7]	Regulation [P637]	zell. Lokalisation
Proteine Kohlenstoffmetabolismus				(SVQ ≤0.6)	(SVQ ≥1.67)	
Q9ER34	ACON_RAT	Aco2	Aconitate hydratase, mitochondrial	down	-	Mito
P51635	AK1A1_RAT	Akr1a1	Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]	up	-	Cts, M
P11884	ALDH2_RAT	Aldh2	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	down	-	Mmt
P04764	ENOA_RAT	Eno1	Alpha-enolase	up	-	Cp, M
Q68FY0	QCR1_RAT	Uqcrc1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	down	-	Mim
P11240	COX5A_RAT	Cox5a	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	down	-	Mim
P09117	ALDOC_RAT	Aldoc	Fructose-bisphosphate aldolase C	p7: abs	-	Cp, Mito, A
P07323	ENOG_RAT	Eno2	Gamma-enolase	down	-	Cp, M
P05370	G6PD_RAT	G6pdx	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	down	-	Cp, Cts
D4A0W9	D4A0W9_RAT	Ganab	Glucosidase, alpha; neutral AB	up	-	ER, Golgi
P04797	G3P_RAT	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	down	-	Cp, Nc
D3ZAP9	D3ZAP9_RAT	Gpd1l	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like	p7: abs	-	Cp
Q99NA5	IDH3A_RAT	ldh3a	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	p7: abs	-	Mito
O88989	MDHC_RAT	Mdh1	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	down	-	Cp
P19804	NDKB_RAT	Nme2	Nucleoside diphosphate kinase B	up	-	Cp, M
P25113	PGAM1_RAT	Pgam1	Phosphoglycerate mutase 1	down	-	Nc, Cts
P49432	ODPB_RAT	Pdhab	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	down	-	Mmt
P11980	KPYM_RAT	Pkm2	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	down	-	Cp, Nc
F1LM47	F1LM47_RAT	Sucla2	Succinyl-CoA synthetase beta-A chain	down	-	Mito, Mmt
Q9EQS0	TALDO_RAT	Taldo1	Transaldolase	up	-	Cp
P48500	TPIS_RAT	Tpi1	Triosephosphate isomerase	down	-	Nc, Cts
P97532	THTM_RAT	Mpst	3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase	-	down	Cp, Mito
P26284	ODPA_RAT	Pdha1	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	-	up	Mmt

Q5X178	ODO1_RAT	Ogdh	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	down	down	Mmt
P29266	3HIDH_RAT	Hibadh	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	p7: abs	-	Mito
Proteine Aminosäuremetabolismus						
D3ZW08	D3ZW08_RAT	Adsl	Adenylosuccinate lyase (Predicted)	down	-	Cp, Mito
P13221	AATC_RAT	Got1	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	down	-	Cp
P47727	CBR1_RAT	Cbr1	Carbonyl reductase [NADPH] 1	up	-	Cp
Q6Q0N1	CNDP2_RAT	Cndp2	Cytosolic non-specific dipeptidase	down	-	Cp
B2RYW9	FAHD2_RAT	Fahd2	Fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 2	down	-	Mito
P10860	DHE3_RAT	Glud1	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	down	-	Mmt
P09606	GLNA_RAT	Glul	Glutamine synthetase	down	-	Cp, Mito
Q4V7C6	GUAA_RAT	Gmps	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	up	-	Cp
P62959	HINT1_RAT	Hint1	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	p7: abs	-	Cp
Q5RJQ4	SIR2_RAT	Sirt2	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2	p7: abs	-	Cp, Csk
O35331	PDXK_RAT	Pdxk	Pyridoxal kinase	down	-	Cp
Proteine Fettmetabolismus						
P14604	ECHM_RAT	Echs1	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	down	-	Mmt
P15650	ACADL_RAT	Acadl	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	down	-	Mmt
Q924N5	ACBG1_RAT	Acsbg1	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase ACSBG1	down	-	Cp, Cpv
D3ZVR7	PGFS_RAT	Fam213b	Prostamide/prostaglandin F synthase	p7: abs	-	Cp, Cts
Proteine Energiemetabolismus						
P39069	KAD1_RAT	Ak1	Adenylate kinase isoenzyme 1	down	-	Cp
P15999	ATPA_RAT	Atp5a1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	down	down	Mim, M
P31399	ATP5H_RAT	Atp5h	ATP synthase subunit d, mitochondrial	down	up	Mito, Mim
P07335	KCRB_RAT	Ckb	Creatine kinase B-type	down	up	Cp
P20788	UCRI_RAT	Uqcrrf1	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	down	-	Mim
Q561S0	NDUAA_RAT	Ndufa10	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	up	-	Mmt
Q641Y2	NDUS2_RAT	Ndufs2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	down	-	Mim
Q66HF1	NDUS1_RAT	Ndufs1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	down	-	Mim
P12075	COX5B_RAT	Cox5b	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	-	up	Mim
Q07116	SUOX_RAT	Suox	Sulfite oxidase, mitochondrial	-	p90: abs	MimS
Proteine Degradation						
Q63570	PRS6B_RAT	Psmc4	26S protease regulatory subunit 6B	up	-	Cp, Nc
G3V8T4	G3V8T4_RAT	Ddb1	DNA damage-binding protein 1	up	-	Nc
P60901	PSA6_RAT	Psmc6	Proteasome subunit alpha type-6	up	-	Cp, Nc
Q9JHW0	PSB7_RAT	Psmc7	Proteasome subunit beta type-7	up	-	Cp, Nc
Q00981	UCHL1_RAT	Uchl1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	up	-	Cp, ER
Q63347	PRS7_RAT	Psmc2	26S protease regulatory subunit 7	-	p90: abs	Cp, Nc
D4AEH3	D4AEH3_RAT	Psmc7	Proteasome (Prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 7 (Predicted)	-	up	P, Np

Proteine Antioxidantia						
O08557	DDAH1_RAT	Ddah1	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	up	-	Mito, Cp
Q6MG60	DDAH2_RAT	Ddah2	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	up	-	Cp
Q9Z0V5	PRDX4_RAT	Prdx4	Peroxiredoxin-4	p90: abs	-	Cp, Sc
O35244	PRDX6_RAT	Prdx6	Peroxiredoxin-6	down	-	Cp, Lyso
P07632	SODC_RAT	Sod1	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	down	up	Cp
Q9Z1B2	GSTM5_RAT	Gstm5	Glutathione S-transferase Mu 5	-	down	Cp
Proteine Transmittermetabolismus						
P51650	SSDH_RAT	Aldh5a1	Succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial		down	Mito
Proteine Biosynthese						
P38983	RSSA_RAT	Rpsa	40S ribosomal protein SA	up	-	M, Cp, Nc
P60123	RUVB1_RAT	Ruvbl1	49 kDa TATA box-binding protein-interacting protein	up	-	Nc
Q68FR6	EF1G_RAT	Eef1g	Elongation factor 1-gamma	up	-	Rs, Cts
P85834	EFTU_RAT	Tufm	Elongation factor Tu, mitochondrial	down	-	Mito
Q6P3V8	Q6P3V8_RAT	Eif4a1	Eukaryotic translation initiation factor 4A1	up	-	Cts
Q4V8K6	Q4V8K6_RAT	Hnrnpc	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (C1/C2)	up	-	Sc
Q794E4	HNRPF_RAT	Hnrnpf	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	up	up	Nc, Np
Q6AY09	HNRH2_RAT	Hnrnp2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	down	-	Nc, Np
P61980	HNRPK_RAT	Hnrnpk	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	up	up	Cp, Nc
P43244	MATR3_RAT	Matr3	Matrin-3	down	-	Nm
G3V6H9	G3V6H9_RAT	Nap111	Nucleosome assembly protein 1-like 1	up	-	Nc
Q5U2Z3	NP1L4_RAT	Nap114	Nucleosome assembly protein 1-like 4	up	-	Nc
Q9JMJ4	PRP19_RAT	Prpf19	Pre-mRNA-processing factor 19	up	-	Nc, Cp
Q925G0	RBM3_RAT	Rbm3	Putative RNA-binding protein 3	p90: abs	-	Nc, Cp
P60892	PRPS1_RAT	Prps1	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1	p7: abs	-	Cts
D4AE41	RMXL1_RAT	Rbmx11	RNA binding motif protein, X-linked-like-1	p90: abs	-	Nc
D3ZL34	D3ZL34_RAT	Sfrs3	Serine/arginine-rich splicing factor 3	p90: abs	-	Nc, Np
P36876	2ABA_RAT	Ppp2r2a	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B alpha isoform	down	-	Cts
Q5XIG8	STRAP_RAT	Strap	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	up	-	Cp, Nc
Q6P799	SYSC_RAT	Sars	Serine--tRNA ligase	up		Cp
Q4KLI7	Q4KLI7_RAT	Sf3a3	Splicing factor 3a, subunit 3, 60kDa	up	up	Nc, Sc
G3V8T5	G3V8T5_RAT	Ruvbl2	48 kDa TBP-interacting protein	-	up	Nc, Cp
Q68A21	PURB_RAT	Purb	Transcriptional activator protein Pur-beta	-	p637: abs	Nc
Proteine Signaltransduktion						
P62260	1433E_RAT	Ywhae	14-3-3 protein epsilon	up	-	Cp, Mel
P68255	1433T_RAT	Ywhaq	14-3-3 protein theta	up	-	Cp
P63102	1433Z_RAT	Ywhaz	14-3-3 protein zeta/delta	up	down	Cp, Mel
P62994	GRB2_RAT	Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2	down	-	Nc, Cp
P04897	GNAI2_RAT	Gnai2	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	up	-	Cp, M

P63245	GBLP_RAT	Gnb211	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	up	-	M, Cp
P63086	MK01_RAT	Mapk1	Mitogen-activated protein kinase 1	down	up	Nc, Cp
P08523	OMP_RAT	Omp	Olfactory marker protein	down	-	Cp
P35213	1433B_RAT	Ywhab	14-3-3 protein beta/alpha	-	down	Cp, Mel
P59215	GNAO_RAT	Gnao1	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha	-	p637: abs	M, hGc
Proteine Regulation						
Q62703	RCN2_RAT	Rcn2	Reticulocalbin-2	up	-	ER
P14669	ANXA3_RAT	Anxa3	Annexin A3	down	-	Cp, M
P14668	ANXA5_RAT	Anxa5	Annexin A5	down	down	Cp, M
P27139	CAH2_RAT	Ca2	Carbonic anhydrase 2	down	-	Cp
P45592	COF1_RAT	Cfl1	Cofilin-1	up	-	Nm, Cp
Q6P7Q4	LGUL_RAT	Glo1	Lactoylglutathione lyase	down	-	Cp
P07936	NEUM_RAT	Gap43	Neuromodulin	up	-	M
P50398	GDIA_RAT	Gdi1	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	up	up	Cp
P50399	GDIB_RAT	Gdi2	Rab GDP dissociation inhibitor beta	up	-	Cp, M
P62138	PP1A_RAT	Ppp1ca	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	up	-	Cp, Nc
Q63945	SET_RAT	Set	SET nuclear oncogene	up	-	Cp, ER, Nc
B0BNJ1	B0BNJ1_RAT	Sri	Sorcিন	p7: abs	-	Cp, M
P70566	TMOD2_RAT	Tmod2	Tropomodulin-2	up	-	Cp, Csk
D4A711	D4A711_RAT	Cab39	Calcium binding protein 39	-	p637: abs	Cp, Cts
P18666	ML12B_RAT	My112b	Myosin regulatory light chain 12B	-	p90: abs	Cts
F1LRG8	F1LRG8_RAT	Rsph1	Radial spoke head 1 homolog	-	up	Nc, Cts
Q5XI73	GDIR1_RAT	Arhgdia	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	-	down	Cp
Chaperone						
P06761	GRP78_RAT	Hspa5	Heat shock 70kDa protein 5	up	-	ER, Mel
P11598	PDIA3_RAT	Pdia3	Protein disulfide-isomerase A3	up	p637: abs	ER, Mel
P38659	PDIA4_RAT	Pdia4	Protein disulfide-isomerase A4	up	-	ER, Mel
Q68FQ0	TCPE_RAT	Cct5	T-complex protein 1 subunit epsilon	up	-	Cp, Cts
Q07439	HSP71_RAT	Hspa1a	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	-	p90: abs	Cp
P82995	HS90A_RAT	Hsp90aa1	Heat shock protein HSP 90-alpha	-	up	Cp, Mel
P34058	HS90B_RAT	Hsp90ab1	Heat shock protein HSP 90-beta	-	up	Cp, Mel
Q5XIM9	TCPB_RAT	Cct2	T-complex protein 1 subunit beta	-	down	Cp
Strukturproteine						
P60711	ACTB_RAT	Actb	Actin, cytoplasmic 1	up	up	Cp, Csk
Q5M7U6	ARP2_RAT	Actr2	Actin-related protein 2	up	-	Cp, Csk
P47942	DPYL2_RAT	Dpysl2	Dihydropyrimidinase-related protein 2	up	-	Cp
Q62952	DPYL3_RAT	Dpysl3	Dihydropyrimidinase-related protein 3	up	-	Cp, Gc
Q9JHU0	DPYL5_RAT	Dpysl5	Dihydropyrimidinase-related protein 5	up	-	Cp
B2GUZ5	CAZA1_RAT	Capza1	F-actin-capping protein subunit alpha-1	up	-	Cp, Csk
P70615	LMNB1_RAT	Lmnb1	Lamin-B1	up	down	Nc, La
P30009	MARCS_RAT	Marcks	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	up	up	Cp, M, La
P19527	NFL_RAT	Nefl	Neurofilament light polypeptide	down	-	Nf, A
P12839	NFM_RAT	Nefm	Neurofilament medium polypeptide	down	-	Nf, Csk, A

B0BNF1	SEPT8_RAT	Sept8	Septin-8	down	-	Cp, Csk
P13668	STMN1_RAT	Stmn1	Stathmin	up	-	Cp, Csk
Q63610	TPM3_RAT	Tpm3	Tropomyosin alpha-3 chain	p90: abs	-	Cp, Csk
P09495	TPM4_RAT	Tpm4	Tropomyosin alpha-4 chain	up	-	Cp, Csk
P47819	GFAP_RAT	Gfap	Glial fibrillary acidic protein	-	up	Cp
B5DFG5	B5DFG5_RAT	Sept6	Septin-6	-	down	Cr, Cp
P68370	TBA1A_RAT	Tuba1a	Tubulin alpha-1A chain	-	up	Cp, Csk
Q4QRB4	TBB3_RAT	Tubb3	Tubulin beta-3 chain	-	up	Cp, Csk
B4F7C2	B4F7C2_RAT	Tubb4	Tubulin, beta 4A class IVa	-	up	Cp, MT
Transportproteine						
P85515	ACTZ_RAT	Actr1a	Alpha-centractin	up	-	Cp, Cts
P85969	SNAB_RAT	Napb	Beta-soluble NSF attachment protein	down	-	M
P62966	RABP1_RAT	Crabp1	Cellular retinoic acid-binding protein 1	up	-	Cp
Q62871	DC1I2_RAT	Dync1i2	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	up	-	Cp, Csk
P55051	FABP7_RAT	Fabp7	Fatty acid-binding protein, brain	up	-	Cp
P55053	FABP5_RAT	Fabp5	Fatty acid-binding protein, epidermal	up	-	Cp
O35987	NSF1C_RAT	Nsfl1c	NSFL1 cofactor p47	p90: abs	-	Nc, Golgi
P02770	ALBU_RAT	Alb	Serum albumin	up	-	Sc
Q9QUL6	NSF_RAT	Nsf	Vesicle-fusing ATPase	down	-	Cp
P81155	VDAC2_RAT	Vdac2	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	down	-	Mom
D4A133	D4A133_RAT	Atp6v1a	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 70kDa, V1 subunit A	-	down	Mito, Cts
P47728	CALB2_RAT	Calb2	Calretinin	-	down	Cp, Gj

3.4.2 Ergebnisse der Proteinidentifikation im Ce

Auch innerhalb des Ce konnten Expressionsunterschiede in den unterschiedlichen Entwicklungsstufen P7 und P90 erfasst werden. Hierbei konnten im Vergleich zu P90 insgesamt 84 Proteine analysiert werden, welche gegenüber P90 differentiell reguliert sind. Hiervon zeigen 41 Proteine eine Hoch- sowie 43 Proteine eine Herunterregulation (Tab. 8).

Tabelle 8: Übersicht der differentiellen Expression der Proteine des Ce in P7 und P637 im Vergleich zu P90.

Kategorie	Menge [P7] (absolute Werte)	Menge [P637] (absolute Werte)
Insgesamt	84	21
Hochregulation	41	10
Herunterregulation	43	11
absent	0	0
absent P90	0	0

Die funktionelle Proteinklasse, welche die höchste differentielle Expression innerhalb des Ce zum Zeitpunkt P7 darstellt, sind die Proteine, welche in regulatorische Prozesse involviert sind (20% Gesamtanteil, Abb. 13). So kommt es hier insgesamt zu einer Hochregulation von zehn Proteinen gegenüber P90, wobei sieben Proteine eine höhere Expression in P90 zeigen und somit in P7 herunterreguliert sind (Abb. 14).

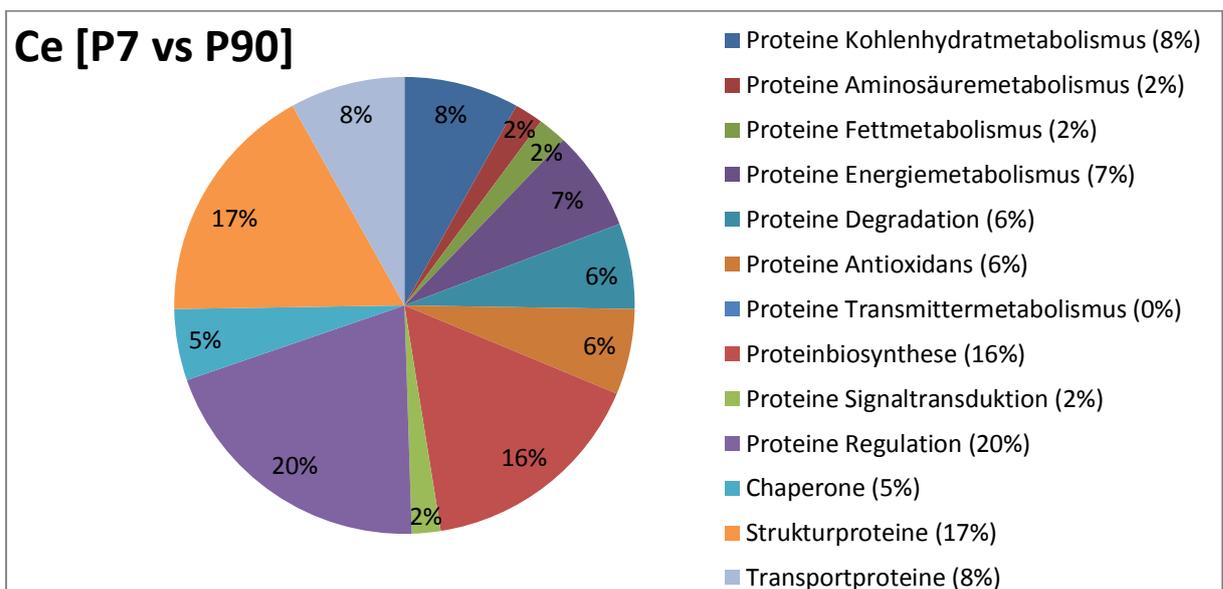


Abbildung 13: Relative Häufigkeit der differentiell exprimierten Proteine innerhalb des Ce [P7 vs P90].

Die Strukturproteine stellen innerhalb des Ce die funktionelle Gruppe dar, welche die nächsthöhere differentielle Expression aufweist. Innerhalb dieser Gruppe (17% Gesamtanteil) konnten insgesamt sechs Proteine nachgewiesen werden, die eine Hochregulation gegenüber P90 aufzeigen. Zudem konnten acht Proteine ermittelt werden, welche im Vergleich zu P90 herunterreguliert sind.

Innerhalb der nächsten funktionellen Gruppe, die der Proteine, welche in Vorgänge der Biosynthese eingebunden sind (16% Gesamtanteil), konnten insgesamt 13 differentiell exprimierte Proteine identifiziert werden. Hiervon sind gegenüber P90 neun Proteine hochreguliert und vier Proteine zeigen im Vergleich eine Herunterregulation.

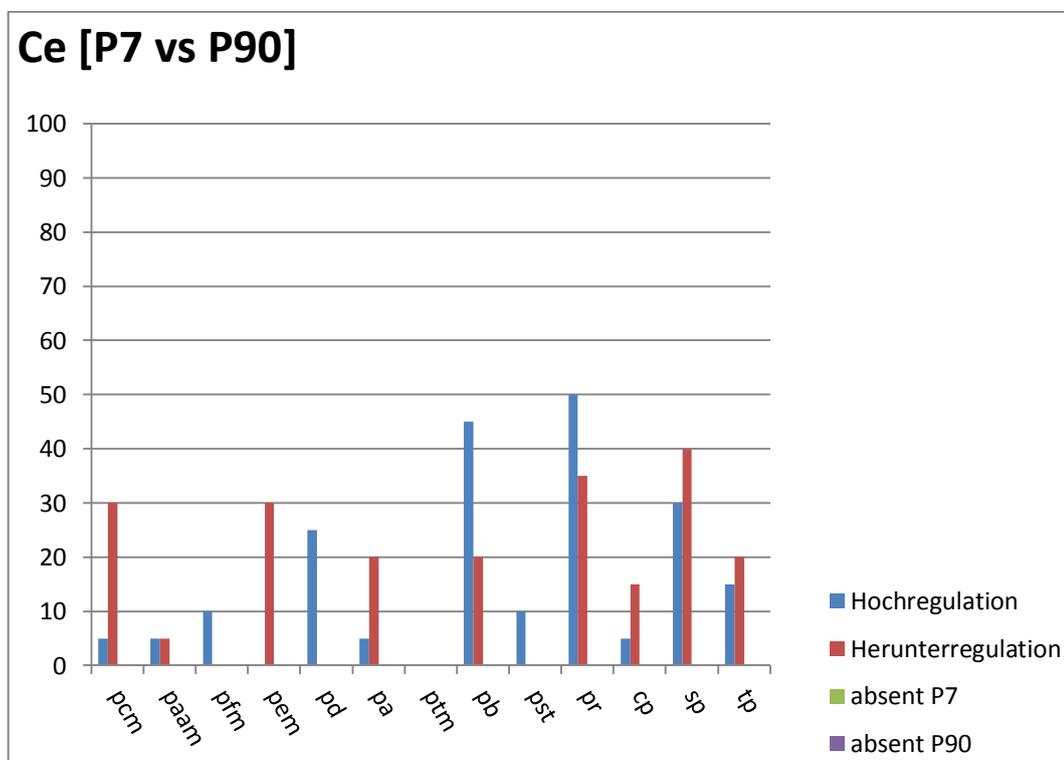


Abbildung 14: Anzahl an differentiiell exprimierten Proteinen der unterschiedlichen Proteinkategorien innerhalb des Ce [P7 vs P90] (20 = 100%).

Des Weiteren konnten auch in den verbleibenden funktionellen Proteinklassen Unterschiede in der differentiellen Expression innerhalb dieser Entwicklungsstufe festgestellt werden. So konnte bei den Transportproteinen (8% Gesamtanteil, drei hochregulierte Proteine gegenüber P90, vier herunterregulierte Proteine), den Proteinen des Kohlenstoffmetabolismus (8% Gesamtanteil, sechs herunterregulierte Proteine sowie ein hochreguliertes Protein), Proteinen des Energiemetabolismus (7% Gesamtanteil, sechs herunterregulierte Proteine), den Proteinen mit degradierender Wirkungsweise (6% Gesamtanteil, fünf hochregulierte Proteine), Proteinen mit

Antioxidanseigenschaften (6% Gesamtanteil, ein hoch- sowie vier herunterregulierte Proteine), den Chaperonen (5% Gesamtanteil, ein hochreguliertes Protein sowie drei herunterregulierte Proteine), Proteinen des Aminosäuremetabolismus (2% Gesamtanteil, ein hoch- sowie ein herunterreguliertes Protein gegenüber P90), den Proteinen, welche in Vorgänge der Signaltransduktion eingebunden sind (Gesamtanteil: 2%, zwei hochregulierte Proteine) sowie den Proteinen, welche am Fettmetabolismus beteiligt sind (2% Gesamtanteil, zwei hochregulierte Proteine) weitere Unterschiede beobachtet werden. Einzig in der Gruppe der Proteine des Transmittermetabolismus konnte keine Veränderung in der differentiellen Expression ermittelt werden.

Betrachtet man als nächstes den Vergleich der Proteinexpression zwischen den Entwicklungsstufen P637 und P90 innerhalb des Ce, können auch hier Unterschiede festgestellt werden. Im Vergleich dieser Zeitpunkte ist jedoch eine deutlich geringere differentielle Expression feststellbar. Insgesamt konnte eine Summe von 21 Proteinen im Vergleich zu P90 als differentiell ermittelt werden, wobei 10 Proteine eine Hochregulation sowie 11 Proteine eine Herunterregulation zeigen (Tab. 8).

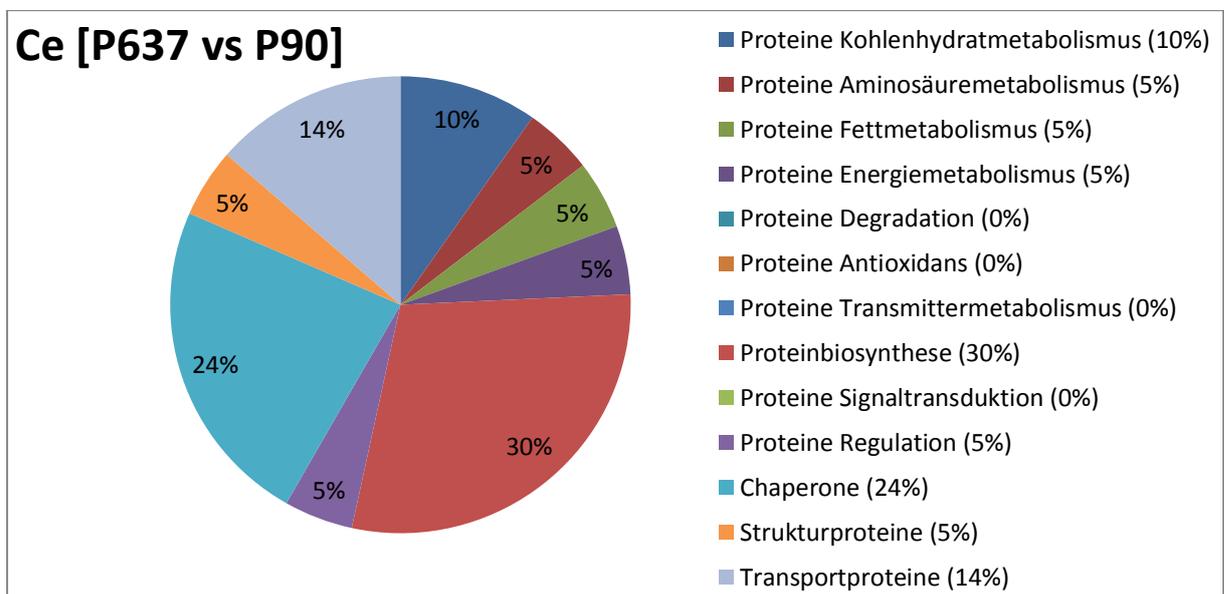


Abbildung 15: Relative Häufigkeit der differentiell exprimierten Proteine innerhalb des Ce [P637 vs P90].

Beginnend auch hier mit den funktionellen Gruppen mit der höchsten differentiellen Expression, befinden sich innerhalb der Gruppe der Proteine der Biosynthese (30% Gesamtanteil, Abb. 15) insgesamt drei Proteine, die gegenüber P90 eine Hochregulation erfahren haben. Zudem konnten drei Proteine detektiert werden, welche herunterreguliert sind (Abb. 16).

Bezüglich der Chaperone (24% Gesamtanteil) wurden im Vergleich zu P90 zwei Proteine als hochreguliert ermittelt, drei Proteine zeigen eine Herunterregulation.

Außerdem konnte festgestellt werden, dass für die Proteine, welche in Transportvorgänge involviert sind (Gesamtanteil 14%), eine Herunterregulation von drei Proteinen erfolgte.

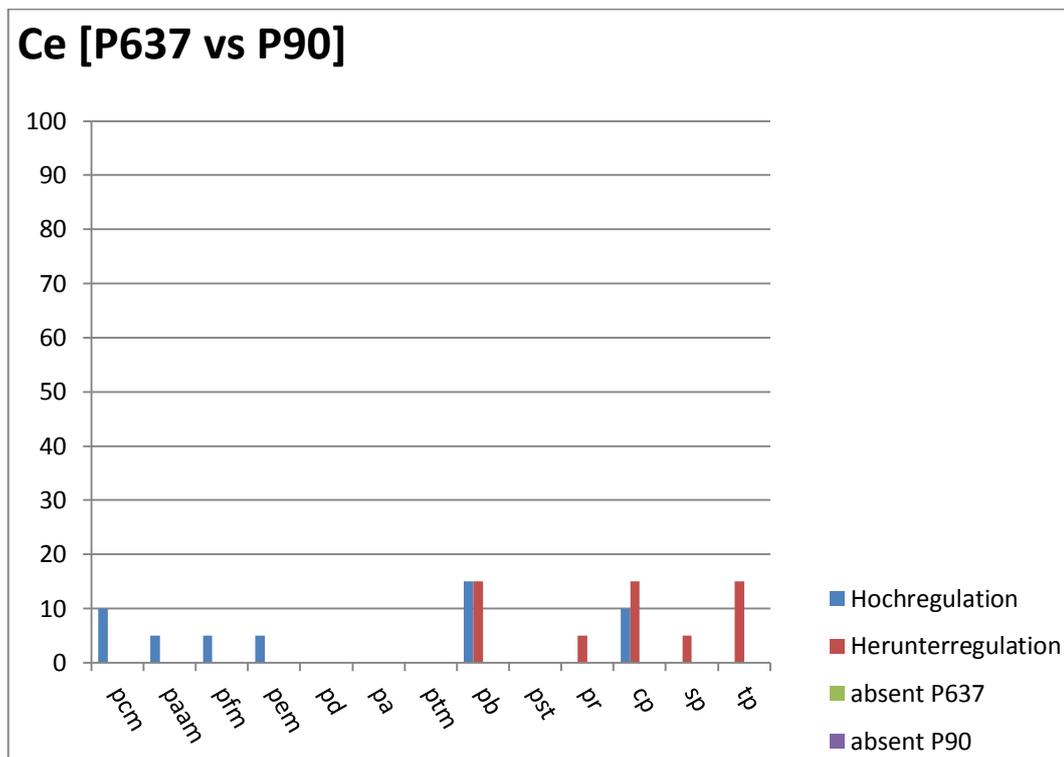


Abbildung 16: Anzahl an differentiell exprimierten Proteinen der unterschiedlichen Proteinkategorien innerhalb des Ce [P637 vs P90] (20 = 100%).

Auch in den übrigen Proteingruppen konnten Unterschiede in der Expression ermittelt werden. So zeigen die Proteine des Kohlenhydratmetabolismus (10% Gesamtanteil) insgesamt zwei hochregulierte Proteine. Ferner sind die Strukturproteine (5% Gesamtanteil, ein herunterreguliertes Protein), regulatorische Proteine (5% Gesamtanteil, ein herunterreguliertes Protein), Proteine des Energiemetabolismus (5% Gesamtanteil, ein hochreguliertes Protein), Proteine des Aminosäuremetabolismus (5% Gesamtanteil, ein hochreguliertes Protein) sowie Proteine des Fettmetabolismus (5% Gesamtanteil, ein hochreguliertes Protein) im Vergleich zwischen den verschiedenen Altersstufen unterschiedlich reguliert. Auch in dieser Entwicklungsstufe konnten keine Unterschiede für die Gruppe der Proteine des Transmittermetabolismus und zusätzlich für die Proteine mit Antioxidanseigenschaften, den Proteinen der Signaltransduktion sowie Proteinen mit degradierender Wirkungsweise im Vergleich zu P90 ermittelt werden.

Tabelle 9: Ergebnistabelle der identifizierten Proteine durch Peptide Mass Fingerprinting der Coomassie gefärbten Gele des Ce. Die Einordnung entspricht der jeweiligen funktionellen Klasse des Proteins. Accession: Accession Nummer (UniProtKB/Swiss-Prot); Entry name: Entry name (UniProtKB/Swiss-Prot); Gene name: von UniProtKB/Swiss-Prot; analysierte Proteine, welche eine differentielle Expression innerhalb beider Entwicklungszeitpunkte zeigten, sind nebeneinander aufgeführt (Regulation [P7]/Regulation [P637]); zell. Lokalisation: Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle (siehe Abkürzungsverzeichnis).

Accession	Entry name	Gene name	Funkt. Gruppe/Protein Name	Regulation [P7]	Regulation [P637]	zell. Lokalisation
Proteine Kohlenstoffmetabolismus (SVQ ≤0.6) (SVQ ≥1.67)						
P08461	ODP2_RAT	Dlat	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	-	up	Mmt
P04764	ENOA_RAT	Eno1	Alpha-enolase	down	-	Cp, M
P07323	ENOG_RAT	Eno2	Gamma-enolase	down	-	Cp, M
P04797	G3P_RAT	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	down	-	Cp, Nc
P04636	MDHM_RAT	Mdh2	Malate dehydrogenase, mitochondrial	-	up	Mmt
Q5XI78	ODO1_RAT	Ogdh	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	down	-	Mmt
P49432	ODPB_RAT	Pdhb	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	down	-	Mmt
D3Z955	D3Z955_RAT	Pgm2l1	Phosphoglucomutase 2-like 1	up	-	Cts
P50137	TKT_RAT	Tkt	Transketolase	down	-	Nc
Proteine Aminosäuremetabolismus						
Q6Q0N1	CNDP2_RAT	Cndp2	Cytosolic non-specific dipeptidase	-	up	Cp
Q4V7C6	GUAA_RAT	Gmps	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	up	-	Cp
P14882	PCCA_RAT	Pcca	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial	down	-	Mmt
Proteine Fettmetabolismus						
Q5XI22	THIC_RAT	Acat2	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	-	up	Cp
O35263	PA1B3_RAT	Pafah1b3	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma	up	-	Cp
Q568Z9	PHYIP_RAT	Phyhip	Phytanoyl-CoA hydroxylase-interacting protein	up	-	Pers
Proteine Energiemetabolismus						
P15999	ATPA_RAT	Atp5a1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	down	up	Mim, M
P31399	ATP5H_RAT	Atp5h	ATP synthase subunit d, mitochondrial	down	-	Mito, Mm
Q561S0	NDUAA_RAT	Ndufa10	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	down	-	Mmt
Q641Y2	NDUS2_RAT	Ndufs2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	down	-	Mim
D3ZG43	D3ZG43_RAT	Ndufs3	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) Fe-S protein 3 (Predicted), isoform CRA_c	down	-	Mito, Mm
P19234	NDUV2_RAT	Ndufv2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	down	-	Mim
Proteine Degradation						
P60901	PSA6_RAT	Psma6	Proteasome subunit alpha type-6	up	-	Cp, Nc
P40112	PSB3_RAT	Psmb3	Proteasome subunit beta type-3	up	-	Cp, Nc
D4A640	D4A640_RAT	Psmb4	Proteasome subunit beta type	up	-	Cp, Nc
Q9JHW0	PSB7_RAT	Psmb7	Proteasome subunit beta type-7	up	-	Cp, Nc
Q4V8E2	Q4V8E2_RAT	Psmd14	Proteasome (Prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 14	up	-	P, Np

Proteine Antioxidantia						
O08557	DDAH1_RAT	Ddah1	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	up	-	Mito, Cp
Q9Z1B2	GSTM5_RAT	Gstm5	Glutathione S-transferase Mu 5	down	-	Cp
Q9Z339	GSTO1_RAT	Gsto1	Glutathione S-transferase omega-1	down	-	Cp, Cts
Q9Z0V6	PRDX3_RAT	Prdx3	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	down	-	Mito
O35244	PRDX6_RAT	Prdx6	Peroxiredoxin-6	down	-	Cp, Lyso
Proteine Biosynthese						
Q6P7P5	BZW1_RAT	Bzw1	Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1	up	-	Cp
Q4KM73	KCY_RAT	Cmpk1	UMP-CMP kinase	up	-	Nc, Cp
P62630	EF1A1_RAT	Eef1a1	Elongation factor 1-alpha 1	up	-	Cp, Nc
Q68FR6	EF1G_RAT	Eef1g	Elongation factor 1-gamma	up	-	Rs, Cts
Q5RK11	IF4A2_RAT	Eif4a2	Eukaryotic initiation factor 4A-II	-	down	Cts
Q32PX7	FUBP1_RAT	Fubp1	Far upstream element-binding protein 1	down	-	Nc
Q794E4	HNRPF_RAT	Hnrnpf	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	up	-	Nc, Np
Q6AY09	HNRH2_RAT	Hnrnp2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	-	up	Nc, Np
P85973	PNPH_RAT	Pnp	Purine nucleoside phosphorylase	up	-	Cp
P62716	PP2AB_RAT	Ppp2cb	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform	-	down	Cp, Nc, Cr
P53042	PPP5_RAT	Ppp5c	Serine/threonine-protein phosphatase 5	down	-	Nc
F1LPS8	F1LPS8_RAT	Pura	Transcriptional activator protein Pur-alpha	down	down	Nc, Cp
Q925G0	RBM3_RAT	Rbm3	Putative RNA-binding protein 3	down	-	Nc, Cp
Q5XIG8	STRAP_RAT	Strap	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	up	up	Cp, Nc
Q4KM49	SYYC_RAT	Yars	Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic	up	up	Cp
P62961	YBOX1_RAT	Ybx1	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	up	-	Cp, Nc, Cpg
Proteine Signaltransduktion						
P97697	IMPA1_RAT	Impa1	Inositol monophosphatase 1	up	-	Cp
P62260	1433E_RAT	Ywhae	14-3-3 protein epsilon	up	-	Cp, Mel
Proteine Regulation						
Q64640	ADK_RAT	Adk	Adenosine kinase	down	-	Cts, Nc
Q02589	ADPRH_RAT	Adprh	[Protein ADP-ribosylarginine] hydrolase	up	-	Cp
Q07936	ANXA2_RAT	Anxa2	Annexin A2	up	-	M, Mel
P27139	CAH2_RAT	Ca2	Carbonic anhydrase 2	down	-	Cp
P45592	COF1_RAT	Cfl1	Cofilin-1	up	-	Nm, Cp
P08082	CLCB_RAT	Cltb	Clathrin light chain B	down	down	Cpv, M
B0BNE5	ESTD_RAT	Esd	S-formylglutathione hydrolase	down	-	Cp, Cpv
P07936	NEUM_RAT	Gap43	Neuromodulin	up	-	M
P50399	GDIB_RAT	Gdi2	Rab GDP dissociation inhibitor beta	up	-	Cp, M
Q63228	GMFB_RAT	Gmfb	Glia maturation factor beta	up	-	Cp
P62749	HPCL1_RAT	Hpcal1	Hippocalcin-like protein 1	down	-	Pem
O88767	PARK7_RAT	Park7	Protein DJ-1	down	-	Cp, Nc, Mito
Q1RP74	Q1RP74_RAT	Tbcb	Tubulin folding cofactor B	up	-	Nc, Cp, MT
P70566	TMOD2_RAT	Tmod2	Tropomodulin-2	down	-	Cp, Csk

P63029	TCTP_RAT	Tpt1	Translationally-controlled tumor protein	up	-	Cp
P11232	THIO_RAT	Txn	Thioredoxin	up	-	Nc, Cp, Sc
Q920J4	TXNL1_RAT	Txn1l	Thioredoxin-like protein 1	up	-	Cp
Chaperone						
Q6P502	TCPG_RAT	Cct3	T-complex protein 1 subunit gamma	-	up	Cp
Q68FQ0	TCPE_RAT	Cct5	T-complex protein 1 subunit epsilon	up	up	Cp, Cts
P34058	HS90B_RAT	Hsp90ab1	Heat shock protein HSP 90-beta	down	down	Cp, Mel
P06761	GRP78_RAT	Hspa5	Heat shock 70kDa protein 5	down	down	ER, Mel
P11598	PDIA3_RAT	Pdia3	Protein disulfide-isomerase A3	down	down	ER, Mel
Strukturproteine						
B2RYJ7	B2RYJ7_RAT	Actr1b	ARP1 actin-related protein 1 homolog B (Yeast)	down	-	Cp, Csk
Q4V7C7	ARP3_RAT	Actr3	Actin-related protein 3	up	-	Cp, Csk
B2GUZ5	CAZA1_RAT	Capza1	F-actin-capping protein subunit alpha-1	up	-	Cp, Csk
Q5XI32	CAPZB_RAT	Capzb	F-actin-capping protein subunit beta	up	-	Cp, Csk
P47819	GFAP_RAT	Gfap	Glial fibrillary acidic protein	down	-	Cp
D4A6B2	D4A6B2_RAT	Immt	Mitochondrial inner membrane protein	down	-	Mito, Mim
P23565	AIXX_RAT	Ina	Alpha-internexin	down	-	Nf
P30009	MARCS_RAT	Marcks	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	up	-	Cp, M, La
P19527	NFL_RAT	Nefl	Neurofilament light polypeptide	down	-	Nf, A
P12839	NFM_RAT	Nefm	Neurofilament medium polypeptide	down	-	Nf, Csk, A
B3GNI6	SEP11_RAT	Sept11	Septin-11	down	down	Cp, A
P13668	STMN1_RAT	Stmn1	Stathmin	up	-	Cp, Csk
Q6AYZ1	TBA1C_RAT	Tuba1c	Tubulin alpha-1C chain	down	-	Cp, Csk
Q3KRE8	TBB2B_RAT	Tubb2b	Tubulin beta-2B chain	up	-	Cp, Csk
Transportproteine						
Q5M7T6	Q5M7T6_RAT	Atp6v0d1	ATPase, H+ transporting, lysosomal 38kDa, V0 subunit d1	up	-	M
Q811Q2	CLIC6_RAT	Clic6	Chloride intracellular channel protein 6	down	down	Cp, M
Q6AYH5	DCTN2_RAT	Dctn2	Dynactin subunit 2	up	-	Cp, M
Q62871	DC1I2_RAT	Dync1i2	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	down	down	Cp, Csk
P55051	FABP7_RAT	Fabp7	Fatty acid-binding protein, brain	up	-	Cp
Q9Z2L0	VDAC1_RAT	Vdac1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	down	down	Mom, M
P81155	VDAC2_RAT	Vdac2	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	down	-	Mom

3.4.3 Ergebnisse der Proteinidentifikation im Co

Nach der massenspektrometrischen Analyse des Co konnten auch hier wesentliche Unterschiede in der differentiellen Expression der verschiedenen Entwicklungsstadien festgestellt werden.

Tabelle 10: Übersicht der differentiellen Expression der Proteine des Co in P7 und P637 im Vergleich zu P90.

Kategorie	Menge [P7] (absolute Werte)	Menge [P637] (absolute Werte)
Insgesamt	82	36
Hochregulation	16	17
Herunterregulation	63	17
absent	2	2
absent P90	1	0

Im Vergleich zu P90 konnten zum Zeitpunkt P7 82 Proteine bestimmt werden, die einen Unterschied in der Expression zu P90 zeigen. So gab es 63 Proteine, die gegenüber P90 herunterreguliert sind, wobei 16 Proteine eine Hochregulation zeigen. Zwei Proteine waren zudem nur in P90 analysierbar und daher sind diese Proteine in P7 absent. Ein Protein ist in P90 absent (Tab. 10).

Beginnend mit der Kategorie an Proteinen mit der größten Menge an differentiell exprimierten Proteinen, den Proteinen des Kohlenstoffmetabolismus (Gesamtanteil: 22%, Abb. 17), zeigt diese Gruppe insgesamt 17 herunterregulierte Proteine sowie ein hochreguliertes Protein gegenüber P90 (Abb.18).

Die Strukturproteine besitzen ebenfalls einen hohen Anteil an differentiell exprimierten Proteinen. Mit einem Gesamtanteil von 13% an differentiell regulierten Proteinen konnten innerhalb dieser funktionellen Proteinklasse insgesamt zwei hochregulierte sowie neun herunterregulierte Proteine gegenüber P90 gefunden werden.

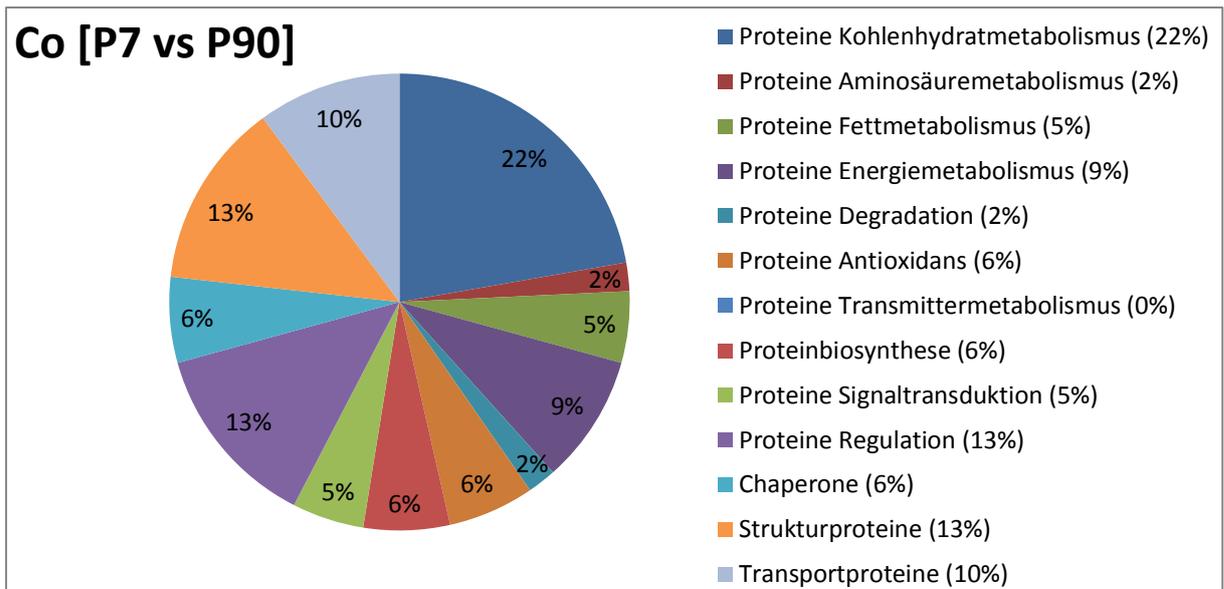


Abbildung 17: Relative Häufigkeit der differentiell exprimierten Proteine innerhalb des Co [P7 vs P90].

Die im Bezug zur höchsten differentiellen Expression mit gleichem prozentualen Anteil identische Gruppe, die Proteine, welche in regulatorische Prozesse der Zelle (13% Gesamtanteil) involviert sind, zeigen insgesamt eine höhere Herunterregulation (neun Proteine, zwei hochregulierte Proteine) im Vergleich zu P90.

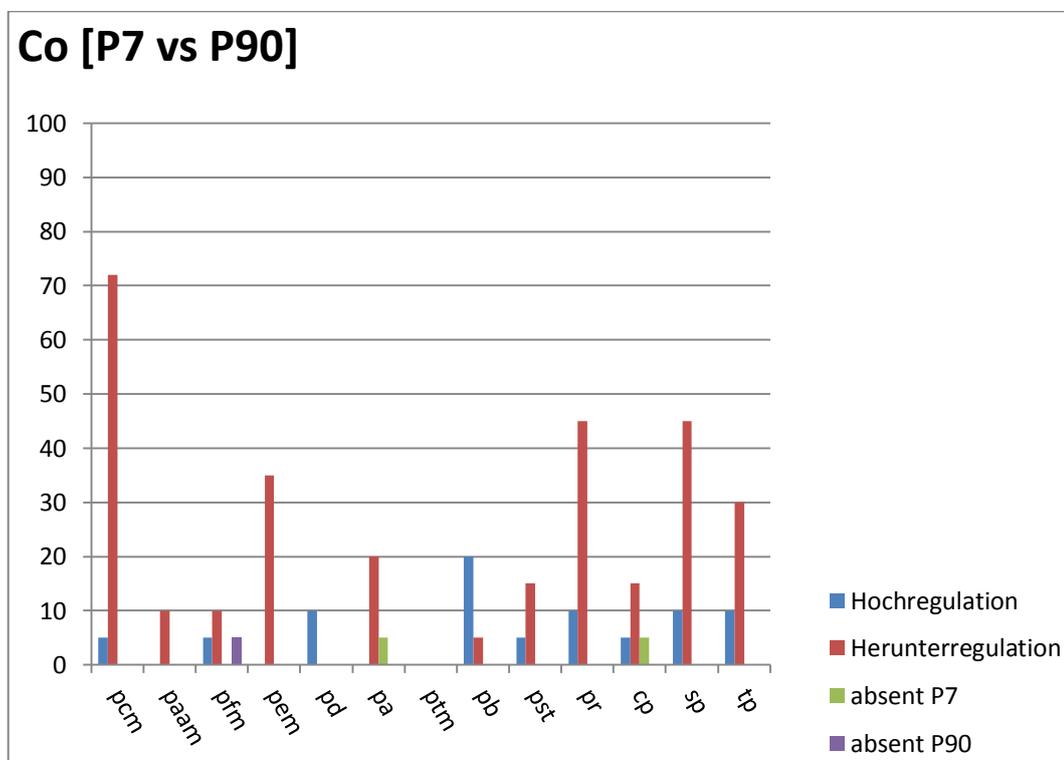


Abbildung 18: Anzahl an differentiell exprimierten Proteinen der unterschiedlichen Proteinkategorien innerhalb des Co [P7 vs P90] (20 = 100%).

Auch in den verbleibenden funktionellen Proteinklassen, den Transportproteinen (10% Gesamtanteil, zwei hochregulierte und sechs herunterregulierte Proteine), den Proteinen des Energiemetabolismus (9% Gesamtanteil, sieben herunterregulierte Proteine), den Chaperonen (6% Gesamtanteil, drei herunterregulierte und ein hochreguliertes Protein, ein absent P7 Protein), Proteinen der Biosynthese (6% Gesamtanteil, vier hochregulierte und ein herunterreguliertes Protein), Proteinen mit Antioxidanseigenschaften (6% Gesamtanteil, vier herunterregulierte Proteine und ein Protein absent zum Zeitpunkt P7), Proteinen des Fettmetabolismus (5% Gesamtanteil, zwei herunterregulierte Proteine, ein hochreguliertes Protein, ein Protein absent zum Zeitpunkt P90), Proteinen mit Beteiligung an der Signaltransduktion (5% Gesamtanteil, ein hochreguliertes sowie drei herunterregulierte Proteine), Proteinen des Aminosäuremetabolismus (2% Gesamtanteil, zwei herunterregulierte Proteine) sowie den Proteinen mit degradierender Wirkungsweise (2% Gesamtanteil, zwei hochregulierte Proteine) konnten Unterschiede in der Expression festgestellt werden. Nur Proteine, welche in den Metabolismus von Transmittern involviert sind, zeigten auch innerhalb dieser Entwicklungsstufe keine detektierbaren Unterschiede in der Analyse.

Bei dem Vergleich der Expression innerhalb des Co zwischen den Zeitpunkten P90 und P637 konnten außerdem differentiell regulierte Proteine ermittelt werden. Insgesamt ist im Vergleich dieser Fraktionen jedoch eine deutlich geringere differentielle Expression feststellbar. Zusammengenommen konnte bei insgesamt 36 Proteinen eine Veränderung in ihrer Expression zwischen beiden Zeitpunkten analysiert werden. Eine Anzahl von 17 Proteinen zeigte eine Hochregulation und 17 Proteine sind herunterreguliert, wobei zwei Proteine nur zum Zeitpunkt P90 vorhanden sind (P637 absent) (Tab. 10).

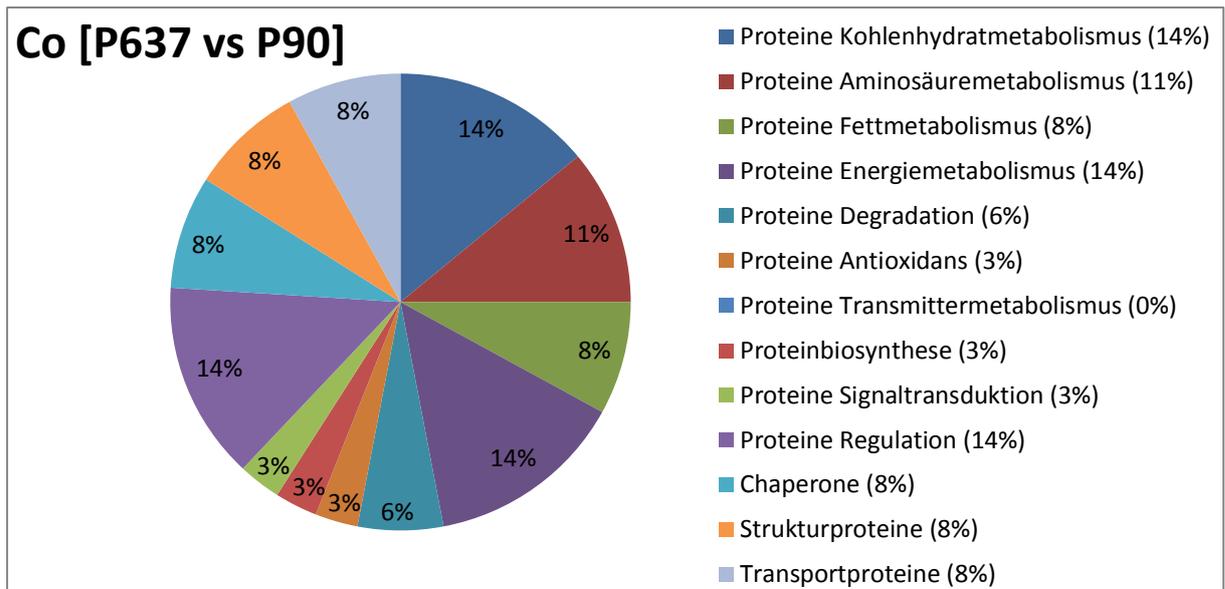


Abbildung 19: Relative Häufigkeit der differentiell exprimierten Proteine innerhalb des Co [P637 vs P90].

Beginnend mit der am höchsten differentiell regulierten Proteinklasse, den Proteinen des Energiemetabolismus (14% Gesamtanteil, Abb. 19), konnten drei Proteine analysiert werden, welche eine Herunterregulation gegenüber P90 zeigen, ein Protein ist hochreguliert und ein Protein ist absent zum Zeitpunkt P637 (Abb. 20). Des Weiteren existieren innerhalb dieser Entwicklungsstufe weitere Proteingruppen mit gleicher differentieller Proteinexpression (14%), die als nächstes genannt werden. So weisen die regulatorischen Proteine insgesamt drei herunterregulierte sowie zwei zu diesem Zeitpunkt hochregulierte Proteine auf. Proteine des Kohlenhydratmetabolismus (drei herunterregulierte und zwei hochregulierte Proteine) besitzen innerhalb dieses Entwicklungszeitpunkts den gleichen Gesamtanteil an differentiell exprimierten Proteinen.

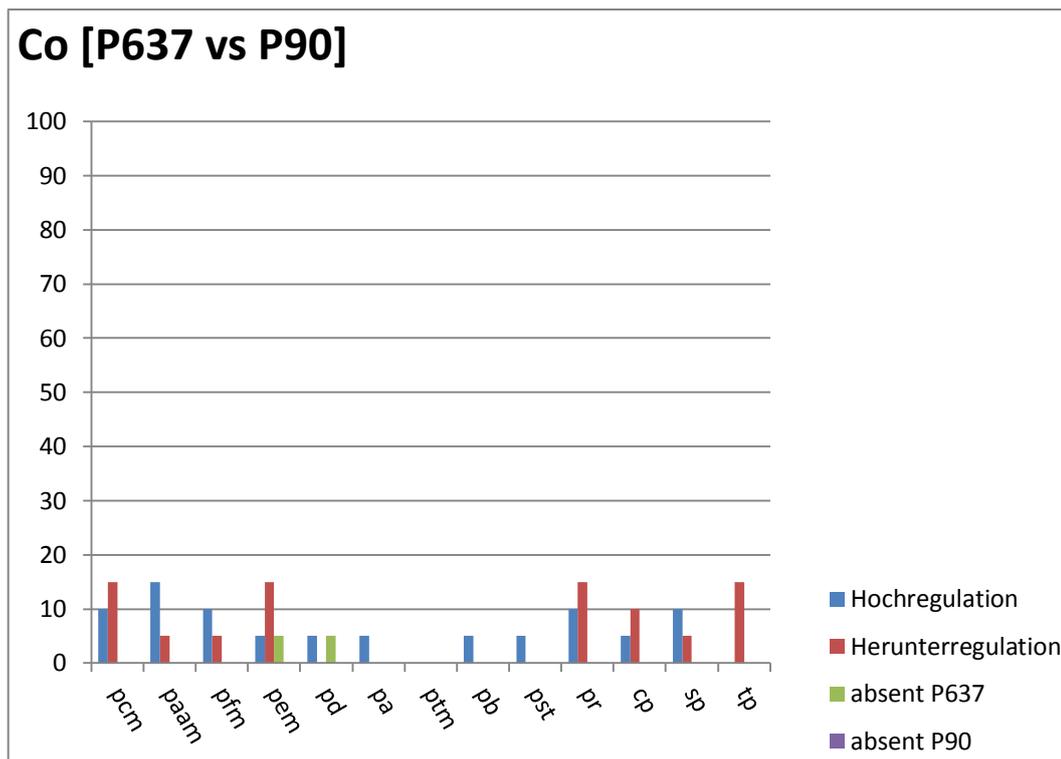


Abbildung 20: Anzahl an differentiell exprimierten Proteinen der unterschiedlichen Proteinkategorien innerhalb des Co [P637 vs P90] (20 = 100%).

Zudem konnte bei den Proteinen, welche in Prozesse des Aminosäuremetabolismus eingebunden sind (11% Gesamtanteil) eine Anzahl von drei hochregulierten und einem herunterregulierten Protein ermittelt werden. Des Weiteren zeigen die Proteine des Fettmetabolismus (Gesamtanteil: 8%) zwei hochregulierte und ein herunterreguliertes Protein gegenüber P90. Die gleiche Menge an differentiell exprimierten Proteinen (Gesamtanteil: 8%) konnte auch bei den Kategorien der Transportproteine (drei herunterregulierte Proteine), den Strukturproteinen (zwei hochregulierte und ein herunterreguliertes Protein) sowie den Chaperonen (ein hochreguliertes und 2 herunterregulierte Proteine) erfasst werden. Die Proteine, welche in degradierende Prozesse involviert sind (Gesamtanteil: 6%, ein hochreguliertes Protein, ein Protein absent in P637), Proteine der Signaltransduktion (Gesamtanteil: 3%, ein hochreguliertes Protein) sowie die Proteine mit Antioxidanseigenschaften (Gesamtanteil: 3%, ein hochreguliertes Protein) und die Proteine der Biosynthese (Gesamtanteil: 3%, ein hochreguliertes Protein) zeigen ebenfalls eine differentielle Expression, diese jedoch in einem geringeren Ausmaß.

Tabelle 11: Ergebnistabelle der identifizierten Proteine durch Peptide Mass Fingerprinting der Coomassie gefärbten Gele des Co. Die Einordnung entspricht der jeweiligen funktionellen Klasse des Proteins. Accession: Accession Nummer (UniProtKB/Swiss-Prot); Entry name: Entry name (UniProtKB/Swiss-Prot); Gene name: von UniProtKB/Swiss-Prot; analysierte Proteine, welche eine differentielle Expression innerhalb beider Entwicklungszeitpunkte zeigten, sind nebeneinander aufgeführt (Regulation [P7]/Regulation [P637]); zell. Lokalisation: Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle (siehe Abkürzungsverzeichnis).

Accession	Entry name	Gene name	Funkt. Gruppe/Protein Name	Regulation [P7]	Regulation [P637]	zell. Lokalisation
Proteine Kohlenstoffmetabolismus (SVQ ≤0.6) (SVQ ≥1.67)						
P51635	AK1A1_RAT	Akr1a1	Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]	up	-	Cts, M
P07943	ALDR_RAT	Akr1b1	Aldose reductase	down	-	Cp
P09117	ALDOC_RAT	Aldoc	Fructose-bisphosphate aldolase C	-	up	Cp, Mito, A
P08461	ODP2_RAT	Dlat	Dihydropyridoxyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	down	-	Mmt
Q01205	ODO2_RAT	Dlst	Dihydropyridoxyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	down	down	Mito
P04764	ENOA_RAT	Eno1	Alpha-enolase	down	up	Cp, M
P07323	ENOG_RAT	Eno2	Gamma-enolase	down	-	Cp, M
P04797	G3P_RAT	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	down	-	Cp, Nc
P42123	LDHB_RAT	Ldhb	L-lactate dehydrogenase B chain	down	-	Cp
O88989	MDHC_RAT	Mdh1	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	down	-	Cp
B1WC26	B1WC26_RAT	Nans	N-acetylneuraminic acid synthase	down	down	Cp, Cts
P26284	ODPA_RAT	Pdha1	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	down	-	Mmt
P49432	ODPB_RAT	Pdhb	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	down	-	Mmt
P25113	PGAM1_RAT	Pgam1	Phosphoglycerate mutase 1	down	-	Nc, Cts
P16617	PGK1_RAT	Pgk1	Phosphoglycerate kinase 1	down	down	Cp
P11980	KPYM_RAT	Pkm2	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	down	-	Cp, Nc
B2RZ24	B2RZ24_RAT	Sucla2	Succinyl-CoA synthetase beta-A chain	down	-	Mito, Mmt
P48500	TPIS_RAT	Tpi1	Triosephosphate isomerase	down	-	Nc, Cts
Q68FY0	QCR1_RAT	Uqcrc1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	down	-	Mim
Proteine Aminosäuremetabolismus						
P10860	DHE3_RAT	Glud1	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	down	up	Mmt
P09606	GLNA_RAT	Glul	Glutamine synthetase	down	up	Cp, Mito
F1M9V7	F1M9V7_RAT	Npepps	Amino-peptidase puromycin sensitive	-	up	Nc, Cp
O09175	AMPB_RAT	Rnpep	Amino-peptidase B	-	down	Sc, Cp
Proteine Fettmetabolismus						
Q5XI22	THIC_RAT	Acat2	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	down	down	Cp
Q6P6R2	DLDH_RAT	Dld	Dihydropyridoxyl dehydrogenase, mitochondrial	-	up	Mmt
P17425	HMCS1_RAT	Hmgcs1	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	up	-	Cp
O35760	IDI1_RAT	Idi1	Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1	p90: abs	-	Per
P30349	LKHA4_RAT	Lta4h	Leukotriene A-4 hydrolase	down	-	Cp
O35264	PA1B2_RAT	Pafah1b2	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	-	up	Cp

Proteine Energiemetabolismus						
P15999	ATPA_RAT	Atp5a1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	down	down	Mim, M
P31399	ATP5H_RAT	Atp5h	ATP synthase subunit d, mitochondrial	down	down	Mito, Mim
P25809	KCRU_RAT	Ckmt1	Creatine kinase U-type, mitochondrial	down	down	Mito, Mim
Q66HF1	NDUS1_RAT	Ndufs1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	down	up	Mim
Q641Y2	NDUS2_RAT	Ndufs2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	down	-	Mim
D3ZG43	D3ZG43_RAT	Ndufs3	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) Fe-S protein 3 (Predicted), isoform CRA_c	down	-	Mito, Mm
P19234	NDUV2_RAT	Ndufv2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	-	p637: abs	Mim
P20788	UCRI_RAT	Uqcrcs1	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	down	-	Mim
Proteine Degradation						
P60901	PSA6_RAT	PsmA6	Proteasome subunit alpha type-6	up	up	Cp, Nc
Q63347	PRS7_RAT	Psmc2	26S protease regulatory subunit 7	up	-	Cp, Nc
Q63570	PRS6B_RAT	Psmc4	26S protease regulatory subunit 6B	-	p637: abs	Cp, Nc
Proteine Antioxidantia						
Q9Z339	GSTO1_RAT	Gsto1	Glutathione S-transferase omega-1	down	-	Cp, Cts
P08009	GSTM4_RAT	Gstm3	Glutathione S-transferase Yb-3	p7: abs	-	Cp
P35704	PRDX2_RAT	Prdx2	Peroxiredoxin-2	down	-	Cp
O35244	PRDX6_RAT	Prdx6	Peroxiredoxin-6	down	-	Cp, Lyso
Q9Z0V6	PRDX3_RAT	Prdx3	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	down	up	Mito
Proteine Biosynthese						
O35567	PUR9_RAT	Atic	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	-	up	Mito, Cts
Q68FR6	EF1G_RAT	Eef1g	Elongation factor 1-gamma	up	-	Rs, Cts
Q510G4	SYG_RAT	Gars	Glycine--tRNA ligase	up	-	Cp, Mito
Q9WTT6	GUAD_RAT	Gda	Guanine deaminase	up	-	Cts
Q6P799	SYSC_RAT	Sars	Serine--tRNA ligase, cytoplasmic	up	-	Cp
P85834	EFTU_RAT	Tufm	Elongation factor Tu, mitochondrial	down	-	Mito
Proteine Signaltransduktion						
P59215	GNAO_RAT	Gnao1	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha	down	-	M, hGc
P54313	GBB2_RAT	Gnb2	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2	down	-	M, Cp
P62994	GRB2_RAT	Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2	-	up	Nc, Cp
P63086	MK01_RAT	Mapk1	Mitogen-activated protein kinase 1	down	-	Nc, Cp
F1M7Y3	F1M7Y3_RAT	Rap1gds1	RAP1, GTP-GDP dissociation stimulator 1	up	-	Cp
Proteine Regulation						
P48037	ANXA6_RAT	Anxa6	Annexin A6	down	-	Cp, Mel
P27139	CAH2_RAT	Ca2	Carbonic anhydrase 2	down	-	Cp
P45592	COF1_RAT	Cfl1	Cofilin-1	down	-	Nm, Cp
Q07266	DREB_RAT	Dbn1	Drebrin	up	-	Cp
P50399	GDIB_RAT	Gdi2	Rab GDP dissociation inhibitor beta	up	-	Cp, M
Q68FS4	AMPL_RAT	Lap3	Cytosol aminopeptidase	-	up	Cp

Q99MZ8	LASP1_RAT	Lasp1	LIM and SH3 domain protein 1	down	down	Cp, Csk
Q64361	LXN_RAT	Lxn	Latexin	down	-	Cp
O88767	PARK7_RAT	Park7	Protein DJ-1	down	-	Cp, Nc, Mito
P62138	PP1A_RAT	Ppp1ca	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	-	up	Cp, Nc
Q6AXV4	SAM50_RAT	Samm50	Sorting and assembly machinery component 50 homolog	down	down	Mom, Cp
P70566	TMOD2_RAT	Tmod2	Tropomodulin-2	down	down	Cp, Csk
Q5RK10	WDR1_RAT	Wdr1	WD repeat-containing protein 1	down	-	Cp, Csk
Chaperone						
P18418	CALR_RAT	Calr	Calreticulin	down	down	ER
P63036	DNJA1_RAT	Dnaja1	DnaJ homolog subfamily A member 1	p7: abs	-	M, La
P63018	HSP7C_RAT	Hspa8	Heat shock cognate 71 kDa protein	up	up	Cp, Mel
P63039	CH60_RAT	Hspd1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	down	-	Mmt
Q5XHZ0	TRAP1_RAT	Trap1	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	down	down	Mito
Strukturproteine						
P60711	ACTB_RAT	Actb	Actin, cytoplasmic 1	down	-	Cp, Csk
Q62950	DPYL1_RAT	Crmp1	Dihydropyrimidinase-related protein 1	up	-	Cp, Csk
P85845	FSCN1_RAT	Fscn1	Fascin	up	up	Cp, Csk
P47819	GFAP_RAT	Gfap	Glial fibrillary acidic protein	down	up	Cp
D4A6B2	D4A6B2_RAT	Immt	Mitochondrial inner membrane protein	down	-	Mito, Mim
P23565	AINX_RAT	Ina	Alpha-internexin	down	-	Nf
P19527	NFL_RAT	Nefl	Neurofilament light polypeptide	down	-	Nf, A
P12839	NFM_RAT	Nefm	Neurofilament medium polypeptide	down	-	Nf, Csk, A
B5DFG5	B5DFG5_RAT	Sept6	Septin-6	down	-	Cr, Cp
B0BNF1	SEPT8_RAT	Sept8	Septin-8	down	down	Cp, Csk
Q6AYZ1	TBA1C_RAT	Tuba1c	Tubulin alpha-1C chain	down	-	Cp, Csk
Transportproteine						
P85515	ACTZ_RAT	Actr1a	Alpha-centractin	up	-	Cp, Cts
P02770	ALBU_RAT	Alb	Serum albumin	up	-	Sc
Q5M7T6	Q5M7T6_RAT	Atp6v0d1	ATPase, H+ transporting, lysosomal 38kDa, V0 subunit d1	down	down	M
P62815	VATB2_RAT	Atp6v1b2	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	down	-	M, Mel
P85969	SNAB_RAT	Napb	Beta-soluble NSF attachment protein	down	down	M
Q9QUL6	NSF_RAT	Nsf	Vesicle-fusing ATPase	down	-	Cp
Q9Z2L0	VDAC1_RAT	Vdac1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	down	down	Mom, M
P81155	VDAC2_RAT	Vdac2	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	down	-	Mom

3.5 Ergebnisse der Western Blot Validierung

Im Folgenden wurden exemplarisch einzelne Proteine, welche eine differentielle Expression in den unterschiedlichen Altersstufen (P7, P90, P637) des oB zeigten, mit Hilfe des Western Blot Verfahrens untersucht. Ziel war es zu überprüfen, ob die mittels massenspektrometrischer Analyse analysierten Ergebnisse mit Hilfe dieser Technik validierbar sind. Eine Überprüfung von weiteren Proteinen wurde außerdem vorgenommen, diese sind in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht gezeigt.

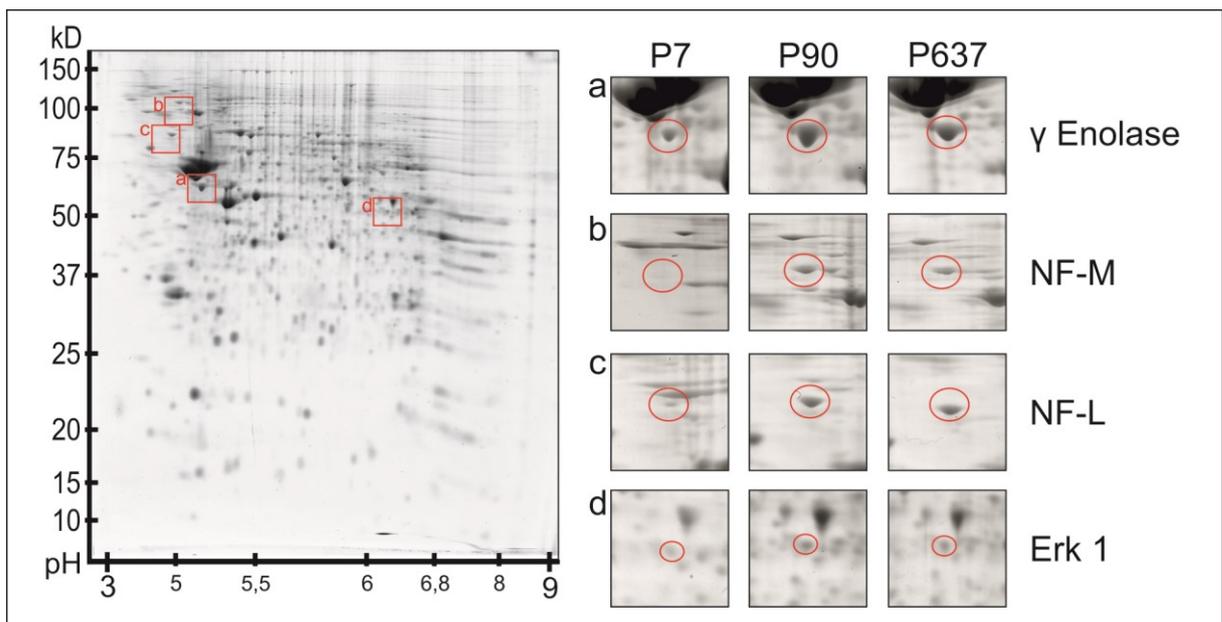


Abbildung 21: Linke Seite: Übersicht eines Kontrollgels (oB, P90) mit Markierungen (Rechtecke a-d), die Einzelspots differenziell regulierter Proteine eingrenzen. Rechte Seite: Vergrößerung der markierten Regionen (a-d) für jede Entwicklungsstufe (P7, P90, P637). Jeder Einzelspot ist hier zusätzlich durch eine kreisförmige Markierung gekennzeichnet.

In Abbildung 21 ist zunächst der jeweilige, dem differentiell exprimierten Protein, zugeordnete Spot gekennzeichnet. Zudem können in Abbildung 22 die Ergebnisse des Western Blot-Versuchs mit dieser verglichen werden. Im Vergleich mit den in den Ergebnis-Tabellen angegebenen Hoch- bzw. Herunterregulationen der untersuchten Proteine konnte ermittelt werden, dass auch die Ergebnisse des Western Blots zum großen Teil die identischen Regulationsunterschiede zeigen.

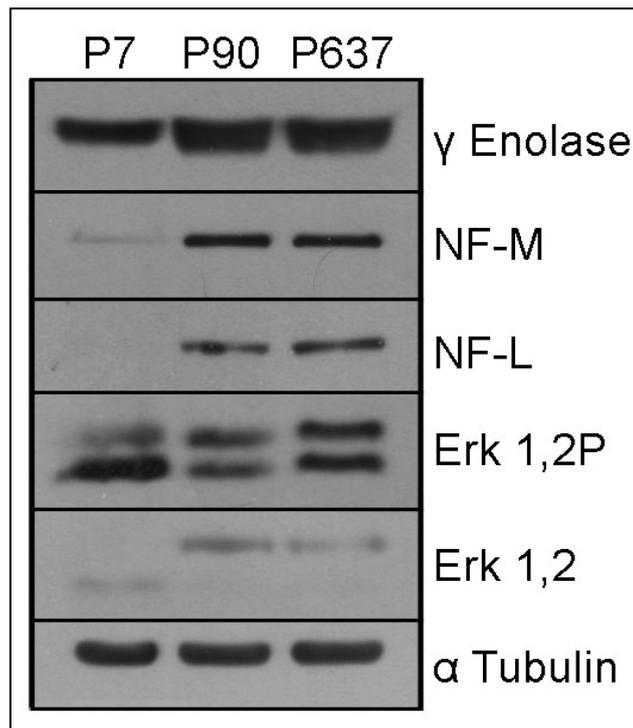


Abbildung 22: Validierung einzelner differentiell exprimierter Proteine des oB mit Hilfe des Western Blot Verfahrens (Mitogen-activated protein kinase 1, 2 (Erk1,2), Phospho Mitogen-activated protein kinase 1, 2 (Erk1,2P), Neurofilament Low (NF-L), Neurofilament Medium (NF-M) und Gamma Enolase (γ Enolase)) zwischen den Alterstufen (P7, P90, P637). Eine Überprüfung von α -Tubulin wurde vorgenommen, um eine gleichmäßige Beladung der Taschen zu garantieren, wobei dieses Protein ebenfalls differentiell exprimiert ist.

So kann auch hier für das Protein des Kohlenstoffmetabolismus Gamma Enolase (γ Enolase, Eno2), den Strukturproteinen (Neurofilament medium polypeptide (NF-M, Nefm) und Neurofilament light polypeptide (NF-L, Nefl)) eine Herunterregulation zum Zeitpunkt P7 festgestellt werden. Zudem ist kein deutlicher Unterschied in der Expression dieser Proteine im Vergleich der Zeitpunkte P90 und P637 zu erkennen. Des Weiteren können auch für das in die Signaltransduktion eingebundene Protein Mitogen-activated protein kinase (Erk 1,2, Mapk1) sowie dessen phosphorilierter Form Phospho-Mitogen-activated protein kinase (Erk 1,2P) Unterschiede in der Bandenstärke anhand des Western Blot Verfahrens festgestellt werden. Diese entsprechen jedoch nicht exakt den im Gelspot vorgefundenen Unterschieden des Grauwerts bzw. den Ergebnissen der massenspektrometrischen Analyse. Eine Überprüfung von α -Tubulin wurde vorgenommen, um eine gleichmäßige Beladung der Taschen zu garantieren, wobei die massenspektrometrische Analyse des Proteins zeigt, dass dieses Protein ebenfalls differentiell exprimiert ist.

4. Diskussion

In der aktuellen Arbeit wurde untersucht, ob und in welcher Weise Unterschiede innerhalb des Proteoms in den drei untersuchten Gehirnregionen (oB, Ce, Co) zu den unterschiedlichen Zeitpunkten (P7, P90, P637) vorhanden sind. Im Folgenden wird darauf eingegangen, in wie weit sich die hier analysierten Befunde in Bezug auf das Überleben und der Differenzierung neuronaler Progenitorzellen auswirken kann, wobei diese mit der Literatur verglichen werden und differentiell exprimierte Proteine funktionell eingeordnet werden.

4.1 Vorkommen der gewählten Proteinklassen innerhalb der unterschiedlichen Regionen

Nach Analyse der differentiellen Expression innerhalb der verschiedenen Regionen und zu den unterschiedlichen Entwicklungsstadien ist zu erkennen, dass sowohl Unterschiede als auch Gemeinsamkeiten festzustellen sind. So ist zu beobachten, dass vor allem die Proteinkategorien des Kohlenhydratmetabolismus, Proteine, welche in regulative Prozesse der Zelle eingebunden sind sowie Proteine des Aminosäure- und Energiemetabolismus die Gruppen sind, bei denen eine hohe differentielle Regulation in allen Regionen und Altersstufen zu finden ist. Des Weiteren konnte auch bei den Proteinklassen der Struktur- und Transportproteine sowie den Chaperonen eine erhöhte differentielle Regulation analysiert werden. Innerhalb der verschiedenen Altersstufen und Regionen sind jedoch auch Unterschiede in der Hoch- bzw. Herunterregulation und dem Nichtvorhandensein (absence) dieser Proteingruppen feststellbar, die im Folgenden diskutiert werden.

4.2 Analyse der differentiell exprimierten Proteine

Zunächst wird auf die differentielle Expression von Proteinen der einzelnen funktionellen Proteinklassen eingegangen, wobei hier zwischen den einzelnen Regionen und Entwicklungszeitpunkten unterschieden wird. Bei der Beschreibung der Proteineigenschaften wird hierbei Bezug auf die Information genommen, welche in Datenbanken (Entrez Gene, GeneCards, UniProtKB/Swiss-Prot, und/oder UniProtKB/TrEMBL) zu erhalten sind. Zudem werden, anhand von vergleichbaren Publikationen, weitere Erkenntnisse über die differentiell exprimierten Proteine, insbesondere funktionelle Aspekte und die Bedeutung dieser Proteine in Hinsicht auf

die Zelldifferenzierung, Neurogenese und Zellmigration, in Beziehung zu den hier erhaltenen Befunden gesetzt.

Die Ergebnisse zeigen, dass einzelne Vertreter der differentiell exprimierten Proteine innerhalb der verschiedenen Regionen und Zeitpunkte der unterschiedlichen Proteinkategorien in mehreren der untersuchten Fraktionen gleichzeitig differentiell reguliert wurden. Ist diesem Fall wird ein Bezug zu diesen Proteinen hergestellt und in den Kontext der neuronalen Entwicklung eingearbeitet. Die Reihenfolge der hier besprochenen funktionellen Proteinklassen gleicht dabei der in den Ergebnistabellen verwendeten Abfolge.

Insgesamt muss betont werden, dass die in dieser Studie analysierten Proteine mit Hilfe der 2D-PAGE nur eine Aussage über die Gesamtregion erlauben. Solange keine spezifischen Markerproteine für bestimmte Zelltypen, beispielsweise Neurone, analysiert wurden, können daher keine zellspezifischen Aussagen gegenüber der differentiellen Expression getroffen werden. Jedoch erlaubt die Analyse eine generelle Aussage über die Ontogenese der einzelnen Gehirnregionen als Gesamtorgane zu treffen. So stellt die Analyse mit Hilfe der 2D-PAGE bzw. MALDI-TOF vor allem die Proteine am besten dar, die einen mittleren pH-Wert besitzen. Proteine mit einem stark sauren oder basophilen isoelektrischen Punkt werden mittels dieser Technik aus diesem Grund schlechter abgebildet und erlauben deshalb eine weniger genaue Messung. Daher erfolgt in dieser Arbeit hauptsächlich die Analyse der Proteine mit einem mittleren isoelektrischen Punkt und einem bestimmten Massenbereich, da sich zu diesen eine genauere Aussage treffen lässt. Zusätzlich muss erwähnt werden, dass in dieser Studie keine Unterscheidung zwischen Enzymen und Proteinen vorgenommen wurde. Dies hat den Grund, dass eine Aussage über die enzymatische Aktivität, welche von Faktoren wie beispielsweise dem Substratangebot oder dem umgebenden pH-Wert beeinflusst wird, nicht getroffen werden kann (Lessner et al., 2010).

4.2.1 Proteine des Kohlenhydratmetabolismus

Die Proteine, welche in unterschiedliche Vorgänge des Kohlenhydratmetabolismus eingebunden sind, zeigen zum Zeitpunkt P7 im Vergleich mit P90 bis auf wenige Ausnahmen insgesamt eine Herunterregulation innerhalb der drei untersuchten Regionen. Im Vergleich des Zeitpunktes P90 mit P637 wird deutlich, dass anhand der analysierten Proteine im Vergleich eine deutlich geringere differentielle

Expression stattfindet. Hierbei ist jedoch keine deutliche Tendenz bezüglich einer insgesamten Hoch- bzw. Herunterregulation innerhalb der Regionen zu erkennen. Ein Großteil der differenziell exprimierten Proteine innerhalb dieser Proteingruppe ist zudem in den Tricarbonsäurezyklus und die Glycolyse involviert.

Das Protein **2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial** (Ogdh), welches die Umsetzung von Alpha-Ketoglutarat zu Succinyl-CoA und CO₂ innerhalb des Tricarbonsäurezyklus katalysiert und außerdem im mitochondrialen Abbau von Glutamat innerhalb granulärer Neurone beteiligt ist (Bunik et al., 2009), zeigt eine Herunterregulation im oB wie auch im Ce zum Zeitpunkt P7.

Des Weiteren zeigt das Protein **Aconitate hydratase, mitochondrial** (Aco2), das an der gegenseitigen Umwandlung von Citrat zu Isocitrat beteiligt ist, eine Herunterregulation zum Zeitpunkt P7 im oB.

Das Protein **Alpha-Enolase** (Eno1) ist innerhalb der Regionen Ce und Co zum Zeitpunkt P7 herunterreguliert, wobei innerhalb des oB eine Hochregulation festgestellt werden kann. Während der Ontogenese kommt es bei diesem Protein zu einem Wechsel der Untereinheiten (α/α Homodimer \rightarrow α/γ Heterodimer) innerhalb von Neuronen. So konnte von Ueta et al. (2004) ein Vorhandensein der α - wie auch der γ -Untereinheiten innerhalb von Synapsen gezeigt werden. Generell besitzt dieses Protein unterschiedliche Eigenschaften während der Differenzierung der Zelle. Insgesamt wird diesem die Eigenschaft eines Stressproteins zugeschrieben (Buillard et al., 1997).

Gamma-Enolase (Eno2) (herunterreguliert zum Zeitpunkt P7 im oB, Ce und Co) katalysiert die Umwandlung von 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat und besitzt zudem neuroprotektive wie auch neurotrophe Eigenschaften (Takei et al., 1991). So bindet diese in der Zellkultur an Neurone in Abhängigkeit von Ca²⁺-Ionen und fördert so das Überleben der Zellen (Hattori et al., 1995). Zudem konnte eine Validierung der differentiellen Regulation dieses Proteins innerhalb des oB mittels Western Blot Analyse gezeigt werden.

Phosphoglyceratmutase 1 (Pgam1) ist im oB wie auch im Co gegenüber P90 herunterreguliert. Im Ce konnte hingegen eine Hochregulation des Proteins **Phosphoglucomutase 2-like 1** (Pgm2l1) nachgewiesen werden. Dies wird für die

glykolytische Umlagerung der Phosphatgruppe von 3-Phosphoglycerat hin zu 2-Phosphoglycerat benötigt.

Das Protein **Fructose-bisphosphate aldolase C** (Aldoc) kann innerhalb des oB als nicht vorhanden zum Zeitpunkt P7 sowie innerhalb des Co als hochreguliert zum Zeitpunkt P637 vorgefunden werden. Insgesamt wird diesem Protein die Eigenschaft der reversiblen Aldol-Spaltung von Fructose-1,6-Biphosphat und Fructose 1-Phosphat hin zu Dihydroxyacetonphosphat und entweder Glyceraldehyd-3-Phosphat oder Glyceraldehyden zugeschrieben. Zudem konnten Leon und Clark (1984) zeigen, dass die C-Isoform vor allem im adulten Gewebe verstärkt exprimiert wird. Zusätzlich ist dieses Protein in regulatorische Prozesse des Zytoskeletts eingebunden. So konnte Buillard et al. (1997) zeigen, dass dieses Protein eine wichtige Rolle in der funktionellen Reifung des cerebellaren Kortex spielt.

Das Protein **Malate Dehydrogenase, cytoplasmic** (Mdh1), welches im oB wie auch im Co zum Zeitpunkt P7 herunterreguliert ist, wie auch das Protein **Malate dehydrogenase, mitochondrial** (Mdh2) (hochreguliert zum Zeitpunkt P637 innerhalb des Ce), katalysiert die reversible Oxidation von Malat zu Oxaloacetat. Hierfür wird das NAD/NADH Cofaktor System des Tricarbonsäurezyklus genutzt, um so den Stoffwechsel zwischen Mitochondrien und dem umgebenden Zytosol zu regulieren.

Verschiedene Vertreter des Pyruvat Stoffwechsels (**Pyruvatdehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial** (Pdhb), herunterreguliert in oB, Ce und Co zum Zeitpunkt P7; **Pyruvatdehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial** (Pdha1), hochreguliert im oB zum Zeitpunkt P637, herunterreguliert zum Zeitpunkt P7 im Co; **Pyruvatkinase isozyme M1/M2** (Pkm2), herunterreguliert in oB und Co zum Zeitpunkt P7; **Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial** (Dlat), hochreguliert im Ce zum Zeitpunkt P637, herunterreguliert zum Zeitpunkt P7 im Co; und **Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial** (Dlst), herunterreguliert im Co zum Zeitpunkt P7 sowie herunterreguliert zum Zeitpunkt P637 im Co) zeigen eine verstärkte differentielle Regulation innerhalb der verschiedenen Regionen. Funktionell kann das als Endprodukt vorhandene Pyruvat der aeroben Glykolyse in den Tricarbonsäurezyklus eingespeist werden oder zu

Alanin transaminiert werden. Ebenfalls bildet Pyruvat das Ausgangsprodukt der Gluconeogenese. Insgesamt kann anhand der Analyse eine vermehrte Herunterregulation zum Zeitpunkt P7 in allen Regionen festgestellt werden, welches sich durch einen erhöhten Energieumsatz im steigenden Alter begründen lässt. Einzelne Abweichungen dieser differentiellen Expression können sich durch eine eventuell vorhandene nicht erfasste posttranslationale Modifikationen erklären lassen.

Insgesamt kann der hier beschriebene Zustand der differentiell regulierten Proteine damit erklärt werden, dass die juvenile Ratte zum Zeitpunkt P7 beispielsweise noch nicht die Menge an Glukose benötigt wie das adulte Tier zum Zeitpunkt P90. So steht dem neonatalen Rattenhirn pränatal durch die plazentare Versorgung des Muttertieres kohlenhydratreiche Ernährung zur Verfügung. Auch nach der Geburt kann durch die Fütterung von Muttermilch eine hohe Menge an Glukose, Laktat und z.B. Ketonkörper der neonatalen Ratte zugeführt werden. So besitzt die Ratte zum Zeitpunkt P5 die höchste Ketonkörperkonzentration, welche anschließend bis zum Zeitpunkt P30 abfällt (Lockwood und Bailey, 1971). Durch den Wechsel des Energiesubstrats im adulten Alter kommt es daher zu einer erhöhten Ausbildung von Proteinen, die für die Metabolisierung, z.B. von Glukose, benötigt werden (Vannucci RC und Vannucci SJ, 2000). So konnte unter normoxischen Bedingungen festgestellt werden, dass die Glukoseaufnahme in der neugeborenen Ratte ein Fünftel des Anteils beträgt, der im adulten Tier genutzt wird (Vannucci et al., 1989). Des Weiteren konnten Wilbur und Patel (1974) zeigen, dass unterschiedliche Proteine, welche in den Tricarbonsäurezyklus wie auch dem Pyruvat Stoffwechsel eingebunden sind, geringe Expressionslevel in neugeborenen Ratten besitzen. Diese werden jedoch deutlich zwischen den postnatalen Tagen P10-P30 erhöht, wobei keine Verringerung im Erwachsenenalter nachgewiesen werden konnte. Teilweise kann zudem im Vergleich der Alterstufe P90 mit dem Zeitpunkt P637 bei einzelnen Proteinen eine zusätzliche Hochregulation beobachtet werden. Eine Erklärung hierfür könnte in der Verminderung der metabolischen Rate bei der Umsetzung von Glukose im hohen Alter liegen, welches beispielsweise zu einer Beeinträchtigung der Ausführung von kognitiven Aufgaben führt. Eine Hochregulation dieser Proteine kann daher einen Indikator für die Reaktion des Tieres darstellen, um einen physiologischen Grundzustand aufrechtzuerhalten und so z.B. genügend Energie für die neuronale Integrität zu liefern.

4.2.2 Proteine des Aminosäuremetabolismus

Die Gruppe der Mitglieder des Aminosäuremetabolismus zeigt insgesamt eine geringere Anzahl differenziell exprimierter Proteine, wobei auch hier eine höhere differentielle Regulation innerhalb des frühen Entwicklungszeitpunktes P7 gegenüber P90 gegeben ist. Einzig innerhalb des Co kann eine erhöhte differentielle Expression zum Zeitpunkt P637 gegenüber P90 festgestellt werden. Zudem wird anhand der analysierten Proteine deutlich, dass diese zum Teil in die regulatorischen Vorgänge des Glutamatmetabolismus involviert sind.

Glutamin Synthetase (Glul) ist zum Zeitpunkt P7 innerhalb des oB wie auch des Co herunterreguliert. Zum Zeitpunkt P637 lässt sich zudem eine Hochregulation innerhalb des Co feststellen. Das Protein ist für die Synthese von Glutamin durch Glutamat und Ammoniak in einer ATP-abhängigen Reaktion zuständig. Daher wird diesem Protein unter anderem eine Rolle für Detoxikationen von Glutamat und Ammoniak zugeschrieben. So spielt Glutamin unter anderem in der Entgiftungsreaktion von Astrozyten wie auch dem Transport von Glutamat zu Neuronen eine Rolle (Schousboe, 2015; Nissim, 1999). Glutamat stellt zudem eine Aminosäure dar, welche für die Biosynthese von verschiedenen Aminosäuren, Pyrimidinen und Purinen verantwortlich ist. Des Weiteren ist es in den Säure-Basen-Haushalt, der Signaltransduktion sowie auch der Zellproliferation eingebunden.

Glutamat Dehydrogenase 1, mitochondrial (Glud1) ist innerhalb des oB wie auch des Co zum Zeitpunkt P7 herunterreguliert, wobei zusätzlich eine Hochregulation zum Zeitpunkt P637 innerhalb des Co festgestellt werden kann. Es ist für die Umwandlung von L-Glutamat in α -Ketoglutarat und Ammoniak verantwortlich. α -Ketoglutarat ist wiederum ein wichtiges Zwischenprodukt innerhalb des Tricarbonsäurezyklus. Zudem wird diesem Protein eine Rolle innerhalb der Prozesse des Lernens und der Gedächtnisbildung durch die Erhöhung der Umsatzsteigerung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat zugesprochen (Schousboe, 2015).

Amino-peptidase puromycin sensitive (NPEPPS) zeigt eine Hochregulation zum Zeitpunkt P637 innerhalb des Co. Dieses Protein ist in unterschiedliche proteolytische Vorgänge wie beispielsweise dem Zellwachstum und dem Überleben von Zellen involviert. Zudem kann diesem Protein eine regulatorische Rolle innerhalb der Neuropeptid Aktivität zugeschrieben werden. So konnte de Gandarias et al. (1999) zeigen, dass die Puromyzin-insensitiven Amino-peptidasen eine wichtige

Funktion für die synaptische Degradation von Peptiden des adulten Gehirns besitzen.

Amino-peptidase B (Rnpep) ist zum Zeitpunkt P637 innerhalb des Co herunterreguliert. Dieser Peptidase wird eine funktionelle Bedeutung innerhalb des Gehirns der Ratte zugesprochen. So konnte Cicin-Sain et al. (2008) zeigen, dass durch die konstitutionelle Hochregulation der serotonergen Aktivität eine Abnahme in der zytosolischen Amino-peptidase-Aktivität verbunden ist. Dies würde somit für eine verminderte differentielle Regulation dieses Proteins innerhalb des Co sprechen.

Das Protein **GMP Synthase** (Gmps) ist innerhalb des oB wie auch des Ce zum Zeitpunkt P7 hochreguliert. Dieses Protein stellt ein wichtiges Enzym innerhalb der *de novo* Synthese von Guanin Nukleotiden dar (Hirst, 1994). Innerhalb der Verstoffwechslung von Nukleotiden sind zwei Proteine in der Umwandlung von IMP (Inosinmonophosphat) hin zu GMP (Guanosinmonophosphat) zuständig. Hierbei katalysiert die GMP Synthase die Aminierung von XMP (Xanthosinmonophosphat) hin zu GMP. Die Akkumulation von Guanin Nukleotiden ist hierbei nicht nur essentiell für die DNA bzw. RNA Synthese, sondern liefert auch GTP, welches für verschiedene zelluläre Prozesse, beispielsweise für die Zellteilung, von Wichtigkeit ist. Des Weiteren kann der GTP-Hydrolyse eine Rolle bei der Glycosylierung (Antonino et al., 1994), Synthese von Adenin Nukleotiden (Stayton, 1983), der Proteintranslation (Simmer et al., 1990) sowie der Aktivierung von G-Proteinen (Hepler und Gilman, 1992) und dem Zusammenbau von Mikrotubuli (Gelfand und Bershinsky, 1991) zugeschrieben werden. Dies könnte auch eine Erklärung dafür sein, dass es zum Zeitpunkt P7 im Vergleich mit P90 in einer hochregulierten Form vorliegt. So ist eine dynamische Organisation des Zytoskeletts (z.B. axonales Wachstum sowie dendritische Entwicklung) für die neuronale Differenzierung essentiell.

4.2.3 Proteine des Fettmetabolismus

Acetyl-CoA Acetyltransferase, cytosolic (Acat2) konnte als hochreguliert im Ce zum Zeitpunkt P637 sowie innerhalb des Co als herunterreguliert zum Zeitpunkt P7 und P637 nachgewiesen werden. Dieses Protein ist in verschiedene Vorgänge des Fett-, wie auch des Energiemetabolismus und der Glykolyse involviert. Zudem konnten Maletta und Timiras (1968) in einer Studie zeigen, dass dieses Protein im cholinergen System bei der Entwicklung des visuellen Kortex beteiligt ist und hierbei

direkten Einfluss auf die funktionelle Reifung dieses Gebietes, speziell bis zum 21. postnatalen Tag der Ratte, besitzt. Es scheint eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der cholinergen Neurotransmission zu spielen. Da es hierbei auch in der Rolle eines neuronalen Transmitters fungiert, kann eine Hochregulation dieses Proteins in den angesprochenen Regionen eventuell so begründet werden.

Die verschiedenen Untereinheiten des Proteins **Platelet-activating factor Acetylhydrolase IB subunit beta** (Pafah1b2) und **Platelet-activating factor Acetylhydrolase IB subunit gamma** (Pafah1b3) zeigen außerdem eine differentielle Regulation. So ist die Beta-Untereinheit innerhalb des Co zum Zeitpunkt P637 hochreguliert, wobei die Gamma Untereinheit im Ce eine Hochregulation zum Zeitpunkt P7 zeigt. Funktionell katalysieren die Untereinheiten dieses Proteins die Entfernung einer Acetyl-Gruppe des Platelet-activating factors innerhalb des Platelet-activating factor acetylhydrolase isoform 1B Komplex. Während der Entwicklung des Gehirns ist dieser Komplex unter anderem bei der neuronalen Migration sowie der kortikalen Schichtenbildung von Bedeutung (Zhang et al., 2009), welches die Hochregulation der Untereinheit innerhalb des Ce erklären könnte. Die zusätzliche Hochregulation des Proteins zum Zeitpunkt P637 innerhalb des Kortex deutet auf eine funktionelle Aufrechterhaltung dieses Proteinkomplexes hin.

Des Weiteren sind die Proteine **Long-chain specific acyl-CoA Dehydrogenase, mitochondrial** (Acadl) sowie die **Long-chain-fatty-acid-CoA ligase** (Acsbg1) innerhalb des oB zum Zeitpunkt P7 herunterreguliert. Beiden Proteine wird eine Bedeutung innerhalb des Fettsäuremetabolismus, beispielsweise bei der Beta-Oxidation von langkettigen Fettsäuren, zugeschrieben. Speziell Acsbg1 unterstützt hierbei innerhalb des Gehirns unter anderem auch die Myelinogenese. Eine Möglichkeit für die differentielle Regulation innerhalb des oB, die verstärkte Expression dieser Proteine nach P7, könnte hierbei als Hinweis darauf gedeutet werden, dass die erhöhte Zunahme an Fett wie auch die vermehrte Generierung von Myelinscheiden zu einem Zeitpunkt stattfindet, der nach der Ausbildung des axonalen Netzwerks geschieht.

4.2.4 Proteine des Energiemetabolismus

Innerhalb des Gehirns kann während der postnatalen Entwicklung eine verstärkte Hochregulation, von in den Energiemetabolismus eingebundenen Proteinen, festgestellt werden (Yan et al., 2008). Zudem konnte gezeigt werden, dass der oxidative Energiemetabolismus mit steigendem Alter eine Verringerung erfährt und somit die Möglichkeit des Gehirns auf eventuelle Stressbedingungen zu reagieren vermindert ist (Villa et al., 2013). Die Mitochondrien stellen die Zellorganellen dar, welche eine zentrale Rolle innerhalb des Energiemetabolismus spielen. So konnten Land et al. (1977) und Hamada-Kanazawa (2011) zeigen, dass speziell diese Organellen eine erhöhte Regulation, unter anderem der Cristae, innerhalb des Gehirns in der postnatalen Phase zwischen P7 und P25 zeigen (Erhöhung um den Faktor 6). Insgesamt konnte eine um den Faktor 11 erhöhte Kapazität der Mitochondrien in dieser Phase festgestellt werden. Des Weiteren können in den Mitochondrien von älteren Tieren weniger respiratorische Untereinheiten der Atmungskette vorgefunden werden und daher kann von einer geringeren Möglichkeit der Energieerzeugung innerhalb dieser ausgegangen werden (Turpeenoja et al., 1988). Eine wichtige Rolle nehmen die Mitochondrien zudem in der Etablierung von neuronalen Netzwerken bzw. der neuronalen Plastizität (neuronalen Differenzierung, Neuriten-Auswuchs, der Neurotransmitterfreisetzung sowie dem dendritischen Umbau), bei der hierfür benötigten Energiebereitstellung (ATP und NAD^+) sowie der Regulation von subzellulärem Ca_2^+ und der Redox-Homöostase ein (Cheng et al., 2010).

Bei einer Großzahl der in dieser Studie identifizierten Proteine des Energiemetabolismus handelt es sich um verschiedene Komponenten und Untereinheiten der Atmungskette sowie der ATP-Synthese. Im Folgenden werden diese daher zusammen aufgeführt bzw. diskutiert.

ATP Synthase subunit alpha, mitochondrial (Atp5a1) ist innerhalb des oB, des Ce und des Co zum Zeitpunkt P7 herunterreguliert. Im oB wie auch im Co lässt sich zudem eine Herunterregulation zum Zeitpunkt P637 beobachten. Auch das Protein **ATP Synthase subunit d, mitochondrial** (Atp5h) konnte innerhalb aller untersuchten Regionen (oB, Ce, Co) zum Zeitpunkt P7 als herunterreguliert sowie zum Zeitpunkt P637 als hochreguliert im oB und als herunterreguliert im Co erfasst werden. Das Protein ATP Synthase selbst stellt ein zentrales Protein für die

Energiegewinnung dar. Die differentielle Herunterregulation dieser Untereinheiten innerhalb der untersuchten Regionen deutet somit auf die im Vorangegangenen angesprochene erhöhte Ausbildung von Mitochondrien zu einem späteren Zeitpunkt als P7 hin. Zudem kann die sich unterscheidende differentielle Regulation zum Zeitpunkt P637 als eine Reaktion des Tieres gesehen werden, einer Abnahme der Energiegewinnung im erhöhten Alter entgegenzuwirken.

Verschiedene Mitglieder der Atmungskette (***NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial*** (Ndufa10), ***NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial*** (Ndufs2), ***NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial*** (Ndufs1), ***NADH dehydrogenase (Ubiquinone) Fe-S protein 3, isoform CRA_c*** (Ndufs3), ***NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial*** (Ndufv2) konnten als differentiell exprimiert analysiert werden. Innerhalb des oB ist Ndufa10 zum Zeitpunkt P7 hochreguliert, im Ce dagegen konnte eine Herunterregulation dieses Proteins zum Zeitpunkt P7 festgestellt werden. Das Protein Ndufs2 ist in allen drei Regionen zum Zeitpunkt P7 herunterreguliert. Ndufs1 liegt in einer herunterregulierten Form innerhalb des oB wie des Co zum Zeitpunkt P7 vor. Das Protein Ndufs3 konnte innerhalb des Ce und des Co als herunterreguliert zum Zeitpunkt P7 identifiziert werden. Ndufv2 zeigte zudem im Ce zum Zeitpunkt P7 eine Herunterregulation; im Co konnte außerdem ein Nichtvorhandensein (absence) dieses Proteins zum Zeitpunkt P637 identifiziert werden.

Generell kann dem Protein NADH Dehydrogenase (Nicotinamidadenindinukleotid-Dehydrogenase, NADH Coenzym Q Oxidoreduktase) eine wichtige Funktion innerhalb der Mitochondrien zugesprochen werden. So bildet diese Oxidoreduktase den Komplex 1 der mitochondrialen Atmungskette und katalysiert in einer gekoppelten Reaktion die Oxidation von NADH mit der Reduktion von Coenzym Q. Bei Betrachtung der Gesamtheit an differentiell regulierten Untereinheiten kann somit insgesamt eine Herunterregulation dieses Proteins innerhalb der untersuchten Regionen zum Zeitpunkt P7 im Vergleich zum Zeitpunkt P90 festgestellt werden. Eine Erklärung hierfür könnte in der erhöhten Expression dieses Proteins während der Neurogenese (Finlay und Darlington, 1995) bzw. der Synaptogenese und Reifung der Neurone und dem damit einhergehenden verstärkten Energieverbrauch liegen (Attwell und Laughlin, 2001).

Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial (Uqcrcfs1) ist jeweils innerhalb des oB wie auch des Co zum Zeitpunkt P7 herunterreguliert. Dieses Protein stellt eine Komponente des Ubiquinol-Cytochrom C Reduktase Komplexes dar, welcher wiederum mit der Erstellung eines elektrochemischen Gradienten sowie der daran gekoppelten ATP-Synthese innerhalb der Mitochondrien in Verbindung gebracht wird. **Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial** (Cox5b) ist innerhalb des oB zum Zeitpunkt P637 in einer hochregulierten Form vorliegend. Auch dieses Protein kann innerhalb der mitochondrialen Atmungskette lokalisiert werden, wo es den Transfer von Elektronen von Cytochrom C hin zu molekularem Sauerstoff katalysiert und somit auch für die Erstellung eines elektrochemischen Gradienten innerhalb der inneren mitochondrialen Membran verantwortlich ist sowie eine regulierende Funktion innerhalb dessen übernimmt.

Die hier differentiell nachgewiesenen Untereinheiten des Cytochrom C Reduktase Komplexes zeigen eine vergleichbare Regulation wie die zuvor aufgeführten Komponenten der NADH Dehydrogenase. Da auch diese innerhalb der Mitochondrien lokalisiert und direkt in den Energiemetabolismus eingebunden sind, sollte die differentielle Regulation beider Untereinheiten-Gruppen vergleichbar sein. Die hier aufgezeigte Hochregulation von Cox5b könnte zudem ein Indiz für einen verstärkten regulatorischen Effekt dieses Proteins im erhöhten Alter darstellen. Eine weitere Möglichkeit in der Hochregulation dieses Proteins in P637 könnte in einer generell erniedrigten Degradationsrate und einer damit einhergehenden Akkumulation des Proteins liegen (Turpeenoja et al., 1988; Bradley et al., 1976).

4.2.5 Proteine mit degradierender Wirkungsweise

Insgesamt konnte eine Vielzahl verschiedener Vertreter des Ubiquitin-Proteasom-Komplexes innerhalb dieser Proteinkategorie nachgewiesen werden. Der Ubiquitin-Proteasom-Komplex selbst besteht aus mehreren Untereinheiten (wobei das Protein Ubiquitin aus 76 Aminosäuren aufgebaut ist), welches eine reversible Bindung an Proteine erlaubt. Abhängig von der Bindung an das Zielprotein wird so dessen Halbwertszeit, Verteilung innerhalb der Zelle oder dessen Funktion bestimmt. Dies erlaubt eine Überprüfung der Proteinqualität, der Signaltransduktion sowie beispielsweise auch die Kontrolle des Zellzyklus. Im Folgenden sind die einzelnen analysierten Vertreter, welche eine differentielle Regulation zwischen den

unterschiedlichen Zeitpunkten aufweisen, zusammengefasst. Anschließend wird eine mögliche Begründung für deren Expressionsmuster diskutiert.

Proteasome subunit alpha type-6 (PsmA6) ist in allen drei untersuchten Regionen zum Zeitpunkt P7 gegenüber P90 hochreguliert. Zusätzlich konnte eine Hochregulation dieses Proteins zum Zeitpunkt P637 innerhalb des Co erfasst werden. Auch **Proteasome subunit beta type-7** (PsmB7) konnte in einer hochregulierten Form innerhalb von P7 des oB wie auch des Ce erfasst werden. Des Weiteren ist eine Hochregulation der **Proteasome subunit beta type-3** (PsmB3) und **Proteasome subunit beta type-4** (PsmB4) zum Zeitpunkt P7 innerhalb des Ce feststellbar.

Zudem konnten weitere Vertreter dieser funktionellen Proteinklasse in Verbindung mit dem Proteasom-Komplex mit einer differentiellen Regulation analysiert werden. Verschiedene Untereinheiten des 26S-Proteasoms (bestehend aus einer zentralen 20S- und zwei 19S-Untereinheiten) waren hierbei detektierbar, wobei eine eindeutige Aussage über das Regulationmuster dieser Proteine nicht möglich ist.

26S protease regulatory subunit 7 (PsmC2) ist zum Zeitpunkt P90 im Vergleich mit P637 innerhalb des oB nicht nachweisbar (absent). Im Co wiederum konnte eine Hochregulation des Proteins zum Zeitpunkt P7 nachgewiesen werden. Des Weiteren ist **Proteasome (Prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 7** (PsmD7) innerhalb des oB zum Zeitpunkt P637 hochreguliert. Auch bei der **26S protease regulatory subunit 6B** (PsmC4) Untereinheit ist eine differentielle Regulation feststellbar. So ist dieses Protein innerhalb des oB zum Zeitpunkt P7 hochreguliert; im Co ist es im Vergleich mit P90 innerhalb von P637 nicht nachweisbar (absent).

Insgesamt ist innerhalb dieser Proteinklasse eine Vielzahl an differentiell exprimierten Proteinen bzw. Untereinheiten des Ubiquitin-Proteasom-Komplexes identifiziert worden, die eine Herunterregulation zum Zeitpunkt P7 im Vergleich mit dem Zeitpunkt P90 zeigen. Ein Grund hierfür könnte ein Schutzmechanismus des Tieres darstellen, fehlgefaltete Proteine, welche wichtig für den korrekten Aufbau und den funktionellen Aspekt von synaptischen Verbindungen während der Entwicklung sind, korrekt zu synthetisieren (Chen et al., 2011). So sind die Synapsen während der Entwicklung einem hochdynamischen Modulierungsprozess ihrer Proteinkomposition unterworfen (Yi und Ehlers, 2009), wobei funktionelle

Veränderungen hierbei durch eine regulierte Proteinsynthese geschehen. Ein zentraler Baustein bei dem Umbau geht hierbei von Ubiquitin aus, welches die Proteine markiert, die von dem proteosomalen Apparat abgebaut werden sollen (Wilkinson et al., 1980). So konnte von Chen et al. (2011) festgestellt werden, dass bei einer Mutation (verbunden mit dem Funktionsverlust) des proteosomalen Apparats in Mäusen neurologische sowie synaptische Defekte auftreten. Des Weiteren konnte die Gruppe zeigen, dass die Expression der proteosomalen Komponenten normalerweise innerhalb der ersten zwei Wochen nach der Geburt im erhöhten Maße induziert wird, welches wiederum die hier analysierten differentiellen Regulationsunterschiede zwischen P7 und P90 unterstützt.

4.2.6 Proteine mit antioxidativer Wirkungsweise

Proteine, die innerhalb unterschiedlicher Stoffwechselwege eine antioxidative Wirkungsweise besitzen, sind für den Organismus von zentraler Bedeutung. So zeichnen sich die Vertreter dieser Gruppe dadurch aus, dass sie als Radikalfänger die Oxidation einer Substanz verlangsamen oder auch verhindern können. Hierbei inaktivieren sie im Organismus die reaktive Sauerstoffspezies (ROS), da ein übermäßiges Vorkommen dieser zu oxidativem Stress führt. Generell wird oxidativem Stress eine große Bedeutung für das Altern zugewiesen und außerdem in Zusammenhang mit der Entstehung einer Reihe von Krankheiten gebracht.

Im Folgenden sind verschiedene Vertreter der Thiol-spezifischen-Antioxidans Familie aufgeführt, die eine differentielle Regulation in den unterschiedlichen Gehirnarealen zeigen. Diese Proteine sind in die Redoxregulation der Zelle involviert, wobei sie zu einer Verminderung von H_2O_2 , kurzkettigen organischen Fettsäuren sowie Phospholipid Hydroperoxiden beitragen können. Demnach sind sie an der Regulation des Phospholipidumsatzes sowie am Schutz der Zelle gegen oxidativen Stress beteiligt.

Peroxiredoxin-6 (Prdx6) ist innerhalb des oB, des Ce wie auch des Co zum Zeitpunkt P7 herunterreguliert. **Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial** (Prdx3) ist innerhalb des Ce und des Co zum Zeitpunkt P7 herunterreguliert. Zudem konnte innerhalb des Co zum Zeitpunkt P637 eine Hochregulation gegenüber P90 analysiert werden. Das Protein **Peroxiredoxin-2** (Prdx2) ist innerhalb des Co zum Zeitpunkt P7 herunterreguliert. **Peroxiredoxin-4**

(Prdx4) konnte außerdem zum Zeitpunkt P90 im Vergleich mit P7 innerhalb des oB als nicht vorhanden (absent) analysiert werden.

Insgesamt kann den Mitgliedern dieser Proteinfamilie eine wichtige Rolle im Entgegenwirken gegenüber oxidativem Stress und mitochondrialer Dysfunktion zugeschrieben werden (Wiggins, 2014). Diese Faktoren sind unter anderem mit der Pathogenese von neuronalen Krankheiten (Kong und Xu, 1998; Teuchert et al., 2006; Terry, 2008; Federico et al., 2012; Eschbach et al., 2013) verknüpft. So konnte in weiteren Arbeiten gezeigt werden, dass beispielsweise sekretiertes Prdx6 in Astrozyten durch Inaktivierung von ROS und Lipidperoxiden innerhalb des Gehirns einen Schutz vor neuronalem DNA Schaden bieten kann und so einem Verlust von Astrozyten wie auch Oligodendrozyten innerhalb des Gehirns der Maus vorbeugt (Jin et al., 2005). Zusätzlich konnte eine verstärkte Expression dieser Proteinfamilie bei neurodegenerativen (Power et al., 2008) sowie neurologischen (Krapfenbauer et al., 2003) Krankheiten gezeigt werden. Dies macht deutlich, dass zumindest zum Zeitpunkt P90 in den hier untersuchten Gehirnarealen und der damit einhergehenden erhöhten Expression ein Entgegenwirken gegenüber den genannten Faktoren gegeben sein könnte.

Außerdem konnten Vertreter der unterschiedlichen Formen des Proteins Glutathion S-Transferase innerhalb dieser funktionellen Gruppe als differentiell reguliert detektiert werden. Die Funktion dieses Proteins liegt dabei in der Detoxifikation von elektrophilen Komponenten, wie beispielsweise oxidativem Stress und umgebungsbedingter Toxine.

Glutathione S-transferase omega-1 (Gsto1) ist innerhalb des Ce wie auch des Co zum Zeitpunkt P7 herunterreguliert. **Glutathione S-transferase Yb-3** (Gstm3) ist in P7 im Vergleich zu P90 nicht vorhanden (absent), wobei **Glutathione S-transferase Mu 5** (Gstm5) innerhalb des Co zum Zeitpunkt P7 herunterreguliert ist und im oB eine Herunterregulation zum Zeitpunkt P637 zeigt. Dieses Protein und die damit einhergehenden Unterformen scheinen somit auch im adulten Tier (Zeitpunkt P90) einen Schutz vor eventuell aufkommenden Komponenten des oxidativen Stresses durch verstärkte Expression zu diesem Zeitpunkt zu bieten.

Das Protein **Superoxide dismutase [Cu-Zn]** (Sod1) konnte zudem innerhalb des oB zum Zeitpunkt P7 herunterreguliert und zum Zeitpunkt P637 als hochreguliert

gegenüber P90 detektiert werden. Dieses Protein bindet Kupfer- und Zinkionen, um so freie Superoxidradikale innerhalb des Körpers hin zu molekularem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid abzubauen. Anhand der analysierten differentiellen Regulation des Proteins kann auch hier von einem Versuch der Zellen innerhalb des Gehirns der Ratte ausgegangen werden, dem vorhandenen oxidativen Stress entgegenwirken zu wollen.

4.2.7 Proteine des Transmittermetabolismus

Dieser Proteinkategorie konnte einzig das Protein ***Succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial*** (Aldh5a1) zugeordnet werden. Dieses ist innerhalb des oB zum Zeitpunkt P637 gegenüber P90 herunterreguliert. Es gehört zu der Familie der Aldehyddehydrogenasen und ist in den Synapsenstoffwechsel eingebunden, wobei ein Mangel dieses Proteins zu fehlerhaften Übertragungen an Synapsen, speziell des Neurotransmitters GABA, führen kann. Daraus resultierend sind Entwicklungsstörungen und Hypotonie (Pearl et al., 2014).

4.2.8 Proteine der Signaltransduktion

Bezüglich der Proteine der Signaltransduktion können auch hier Unterschiede in der differentiellen Regulation einzelner Proteingruppierungen festgestellt werden. So konnte eine hohe Anzahl an Isoformen der 14-3-3 Proteinfamilie innerhalb der untersuchten Gehirnregionen als hochreguliert zum Zeitpunkt P7 identifiziert werden. Die Mitglieder dieser Familie bestehen insgesamt aus sieben unterschiedlichen Isoformen (Beta, Gamma, Epsilon, Sigma, Zeta, Tau und Eta) und sind funktionell als Phospho-Serin/Phospho-Threonin bindende Proteine zu betrachten (Chen et al., 2011; Gardino und Yaffe, 2011). Sie sind in eine Vielzahl unterschiedlicher zellulärer Funktionen, wie beispielsweise dem Stoffwechsel und Proteintransport, der Signaltransduktion sowie der Apoptose und der Zellzyklusregulation involviert (Tzivion and Avruch, 2002; Gardino und Yaffe, 2011). Wie schon einleitend angesprochen, konnten die Isoformen ***14-3-3 protein epsilon*** (Ywhae), ***14-3-3 protein theta*** (Ywhaq) und ***14-3-3 protein zeta/delta*** (Ywhaz) innerhalb des oB als hochreguliert zum Zeitpunkt P7 im Vergleich mit P90 analysiert werden. Zudem konnte eine Herunterregulation des Proteins Ywhaz sowie des ***14-3-3 protein beta/alpha*** (Ywhab) Proteins zum Zeitpunkt P637 innerhalb dieser Region festgestellt werden. Auch innerhalb des Ce ist eine Hochregulation von Ywhae zum Zeitpunkt P7 gegeben. Brodie et al. (1997) und Zhou et al. (1999) konnten

demonstrieren, dass 14-3-3 Proteine auch in einer Vielzahl von neuronalen Prozessen wie der Synaptogenese und dem Lernen, wie auch der Gedächtnisreifung beteiligt sind. Somit kann dies gleichzeitig eine Erklärung für die hier beobachtete Hochregulation der Proteine zum Entwicklungszeitpunkt P7 in den angesprochenen Regionen sein. Des Weiteren zeigte Toyo-oka et al. (2014), dass durch die direkte Interaktion von 14-3-3 Proteinen mit phosphoryliertem Delta-Catenin eine neuronale Differenzierung von Vorläuferzellen bewerkstelligt werden kann. So können die Vorläuferzellen hierbei mit Hilfe von radialen Gliazellen und einer durch die Catenin/Rho-GTPase/Limk1/Cofilin-Signalkaskade induzierten F-Aktin-Formation zu ihrem Zielstandort innerhalb des Co wandern.

Auch verschiedene Untereinheiten der Guanin-Nucleotid-binding Proteine (G-Proteine) zeigten eine differentielle Regulation. Diese sind funktionell an der Modulation in verschiedenen transmembranösen Signalkaskaden beteiligt. **Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2** (Gnai2) und **Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1** (Gnb2l1) zeigen hierbei eine Hochregulation zum Zeitpunkt P7 innerhalb des oB. **Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha** (Gnao1) ist im oB nicht nachweisbar (absent) zum Zeitpunkt P637 und innerhalb des Co zum Zeitpunkt P7 herunterreguliert vorliegend, wie auch die Untereinheit **Guanine nucleotide-binding protein G(l)/G(s)/G(t) subunit beta-2** (Gnb2). Eine deutliche Tendenz in der Expression lässt sich somit nicht bestimmen, jedoch kann eine verstärkte Expression auf neuronales Wachstum (Andreopoulos et al., 1995) bzw. eine Verlängerung des Nervenzellfortsatzes (Strittmatter et al., 1990) hindeuten.

Das Protein **Mitogen-activated protein kinase 1** (Mapk1) konnte innerhalb des oB wie auch des Ce zum Zeitpunkt P7 als herunterreguliert analysiert werden. Zusätzlich zeigt es eine Hochregulation zum Zeitpunkt P637. Die Unterschiede der Expression innerhalb des oB konnten zudem mittels Western Blot Analyse teilweise validiert werden. Das Protein stellt eine zentrale Komponente des Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK, ERK) Signalweges dar. Zudem ist es essentiell für die korrekte Entwicklung der Progenitorzellen des Gyrus dentatus. Im adulten Gehirn konnte eine essentielle Rolle der ERK1/2 Proteine für die synaptische Plastizität des Hippocampus sowie dem räumlichen Gedächtnis nachgewiesen werden (English und Sweatt, 1997; Selcher et al., 2001).

4.2.9 Proteine der Proteinbiosynthese

Eine Vielzahl der Mitglieder der „Heterogeneous nuclear ribo-nucleoprotein“-Familie konnte in dieser Arbeit mit einer differentiellen Regulation zwischen den unterschiedlichen Alterstufen bestimmt werden. So ist ***Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F*** (Hnrnpf) innerhalb des oB zum Zeitpunkt P7 und P637 in einer hochregulierten Form vorliegend. Im Ce ist es zum Zeitpunkt P7 hochreguliert. Das Protein ***Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2*** (Hnrnp2) ist im oB zum Zeitpunkt P7 und im Ce zum Zeitpunkt P637 herunterreguliert. Des Weiteren zeigt innerhalb des oB das Protein ***Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (C1/C2)*** (Hnrnpc) sowie ***Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K*** (Hnrnpk) eine Hochregulation zum Zeitpunkt P7, wobei Hnrnpk auch zum Zeitpunkt P637 in hochregulierter Form vorliegt. Insgesamt sind die Vertreter dieser Proteinfamilie in den mRNA Stoffwechsel, microRNA Biogenese und weiteren dynamischen Veränderungen der DNA involviert. Hnrnpk kann zwar eine dem alternativen Spleißen in Verbindung stehenden neuronalen Differenzierung zugeordnet werden (Raimondi et al., 2002); eine direkte Verknüpfung der Regulationsunterschiede der übrigen Proteine zu den verschiedenen Zeitpunkten kann aber nicht in direkter Relation mit entwicklungspezifischen Vorgängen, z.B. der Neuro- oder der Synaptogenese gesetzt werden. Tollervey et al. (2011) konnte in einer Studie jedoch herausfinden, dass speziell Gene mit metabolischen Funktionen während der Entwicklung Veränderungen zeigen, welche wiederum mit dem alternativen Spleißen einhergeht. Dies wiederum könnte als Hinweis dafür dienen, dass alternatives Spleißen relevanter Proteine durch transkriptionelle Regulation der molekularen Maschinerie auf die Reparatur von DNA-Schäden durch Oxidation innerhalb des Gehirns wirkt (Lu et al., 2004; Su et al., 2008).

Verschiedene Elongationsfaktoren zeigen ebenfalls eine differentielle Regulation im Vergleich der Regionen und Entwicklungszeitpunkte. ***Elongation factor 1-gamma*** (Eef1g) konnte in allen untersuchten Regionen als differentiiell exprimiert analysiert werden. So zeigt dieser Faktor insgesamt eine Hochregulation zum Zeitpunkt P7 innerhalb des oB, Ce und Co. ***Elongation factor Tu, mitochondrial*** (Tufm) ist innerhalb des oB und Co zum Zeitpunkt P7 herunterreguliert. Das Protein ***Elongation factor 1-alpha 1*** (Eef1a1) zeigt innerhalb des Ce zum Zeitpunkt P7 zudem eine Hochregulation. Die Faktoren Eef1g und Eef1a1 stellen jeweils Untereinheiten des Elongationfaktor-1 Komplexes dar, wobei diese wie auch Tufm

für die enzymatische Lieferung von Aminoacyl tRNAs hin zum Ribosom während der Proteinbiosynthese zuständig sind. Eine direkte Verbindung der Expressionsunterschiede dieser Faktoren lässt sich mit der neuronalen Entwicklung anhand von Publikationen nicht herstellen, jedoch kann bezüglich der Hochregulation aller Faktoren zum Zeitpunkt P7 im Vergleich mit P90 zumindest tendenziell eine Erhöhung der Stoffwechselaktivität bzw. der Biosynthese von Proteinen innerhalb der Gehirnregionen als Grund vermutet werden.

Auch Untereinheiten der Serin/Threonin Phosphatasen konnten als differentiell reguliert nachgewiesen werden. So zeigt die **Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B alpha isoform** (Ppp2r2a) eine Herunterregulation zum Zeitpunkt P7 innerhalb des oB. **Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform** (Ppp2cb) sowie **Serine/threonine-protein phosphatase 5** (Ppp5c) zeigen eine Herunterregulation zum Zeitpunkt P7 innerhalb des Ce. Die Proteine der Serin/Threonin Phosphatasen stellen eine Gruppe dar, die eine Entfernung von Phosphat-Gruppen von Serin/Threonin Rückständen mittels der Hydrolyse von Phosphorsäure-Monoestern katalysieren. Sie wirken so den Kinasen sowie Phosphorylasen direkt entgegen und sind daher ein wesentlicher Bestandteil in vielen unterschiedlichen Signaltransduktionskaskaden.

So kann der Ppp2r2a wie auch Ppp2cb, welche beide Untereinheiten der Serin/Threonin Phosphatase 2 darstellen, beispielsweise eine Rolle in der Negativ-Kontrolle von Zellwachstum und Zellteilung zugeschrieben werden. Price et al. (1999) konnten zudem zeigen, dass Protein Phosphatase 2A einzigartige Funktionen in neuronalen Zellen besitzt. Innerhalb von Neuronen scheint das Protein in die Regulation der Stabilität von Neurofilamenten, wie auch der Interaktion mit weiteren Komponenten des Zytoskeletts eingebunden zu sein (Janssens und Goris, 2001).

4.2.10 Regulationsproteine

Das Protein **Neuromodulin** (Gap43) ist im oB wie auch im Ce zum Zeitpunkt P7 im Vergleich mit P90 in einer hochregulierten Form vorliegend. Dieses Protein präsentiert ein Neuronen-spezifisches Phosphoprotein, welches in der Entwicklung und der funktionellen Modulation von Synapsen in Zusammenhang gebracht werden kann (Benowitz et al., 1988). Während der Entwicklung ist Gap43 eines der wenigen Proteine, das selektiv in Verbindung mit dem neuronalen Wachstumsprozess steht

(Perrone-Bizzozero et al., 1986); die Synthese bzw. Expression dieses Proteins besteht während der Axo- und Synaptogenese in hoher Menge, wobei ein plötzlicher Abfall in der Produktion nach Etablierung von stabilen synaptischen Kontakten beobachtet werden kann (Perry et al., 1987; Moya et al., 1987; Kalil et al., 1986; Freeman et al., 1986; Benowitz et al., 1983; Skene et al., 1981; Benowitz et al., 1981). Jacobson et al. (1986) konnten zudem zeigen, dass innerhalb des Rattengehirns die Menge an Gap43 am höchsten innerhalb der ersten postnatalen Woche liegt, in den folgenden Wochen dann aber ein Abfall von über 90% gemessen werden kann. Console-Bram et al. (1996) konnten außerdem zeigen, dass die Expression von Gap43 mRNA auch im Ce vor allem innerhalb der ersten postnatalen Woche am höchsten ist, was wiederum eine Einbindung dieses Proteins in die Granularzell-Differenzierung und Migration, Axogenese sowie dendritische Synaptogenese dieser Region signalisiert (Benowitz et al., 1988).

Tropomodulin-2 (Tmod2), die neuronale Isoform des Tropomodulins, ist ein weiteres regulatorisches Protein, welches eine differentielle Regulation innerhalb der untersuchten Regionen zeigt. Dieses Protein ist im oB hochreguliert, im Ce und Co hingegen in herunterregulierter Form zum Zeitpunkt P7 vorliegend. Es ist dafür bekannt in der Organisation des Zytoskeletts, speziell in der Kombination mit Tropomyosin einen regulativen Einfluss auf die Aktinfilamente zu besitzen. Hierbei stabilisiert das Protein die Aktinfilamente und reguliert ihre Länge (Kong et al., 2006; Kostyukova et al., 2005).

Ein weiteres regulatorisches Protein, welches in die Organisation von Aktin und auch insgesamt in die Zellmorphologie eingebunden ist stellt **Cofilin-1** (Cfl1) dar. Es ist innerhalb des oB und des Ce hochreguliert, während es innerhalb des Co zum Zeitpunkt P7 eine Herunterregulation zeigt. Auch Gurniak et al. (2005) konnten zeigen, dass speziell in den frühen Stufen der Entwicklung eine hohe Expression dieses Proteins essentiell für die neuronale Entwicklung in der Maus ist. So ist beispielsweise der Verschluss der Neuralleiste, verbunden mit der hierfür benötigten Zellmigration, durch ein Fehlen des Cfl1 stark beeinträchtigt.

Das Protein **Drebrin** (Dbn1) konnte als hochreguliert innerhalb des Co zum Zeitpunkt P7 analysiert werden. Dbn1 ist ein neuronenspezifisches und gleichzeitig synaptisch lokalisiertes Protein, welches auch am neuronalen Wachstum beteiligt ist. So konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression dieses Proteins vor allem zwischen

E19 und der ersten postnatalen Woche messbar ist. Zudem kann eine verstärkte Abnahme dieses im Gehirn lokalisierten Proteins im Alter mit pathogenetischen Merkmalen, wie dem Gedächtnisverlust bei der Alzheimer-Krankheit einhergehen (Gerdin, 2010).

Die Proteinfamilie der Annexine ist eine Gruppe, welche die Eigenschaft besitzt in Kalziumabhängigkeit an Lipide (meist saure Phospholipide) der Zellmembran mit einer oder mehreren negativen Ladungen zu binden und dabei zu Trimeren oder Hexameren zu oligomerisieren. Kommt es hierbei zu einer Hexamerbildung, resultieren daraus meist Ionenkanal-Transportproteine. So ist die Gruppe der Annexine neben den Calmodulinen eine der zwei wichtigen Kalzium-bindenden Proteingruppen (McNeil et al., 2006).

Anhand der Regulationsanalyse dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass innerhalb des oB das Protein **Annexin A3** (Anxa3) wie auch **Annexin A5** (Anxa5) zum Zeitpunkt P7 herunterreguliert ist. Zudem ist eine Herunterregulation von Anxa5 zum Zeitpunkt P637 gegeben. **Annexin A6** (Anxa6) ist innerhalb des Co zum Zeitpunkt P7 herunterreguliert und **Annexin A2** (Anxa2) zeigt eine Hochregulation zum Zeitpunkt P7 innerhalb des Ce.

Bezüglich der herunterregulierten Proteine (Anxa3, Anxa5 und Anxa6) kann anhand der Arbeiten von Giambanco et al. (1993) gezeigt werden, dass beispielsweise bei Anxa5 während der Differenzierung in kultivierten Gliomzellen primär eine Akkumulation an Stelle einer verstärkten Expression dieses Proteins stattfindet. Es ist bekannt, dass die Gehirnentwicklung sowie die Maturation der Ratte postnatale Ereignisse sind, wobei die gliale Zellproliferation und Differenzierung nach P10 und die Synaptogenese während der dritten und vierten postnatalen Woche stattfindet (Eayrs und Goodhead, 1959; Aghajanian und Bloom, 1967; Caley und Maxwell, 1968). Des Weiteren konnte Giambanco et al. (1993) zeigen, dass die Speicherung von Anxa5 eine starke Zunahme erst nach der ersten postnatalen Woche zeigt, sodass die differentielle Regulation in Verbindung mit der Gehirnentwicklung gebracht werden kann.

4.2.11 Chaperone

Allgemein dienen die Chaperone der korrekten Faltung von Proteinen, damit diese nach ihrer Synthese in ihrer funktionell korrekten Konformation vorliegen, um so die

physiologische Funktion ausüben zu können. Vor allem bei Proteinen mit einem komplexeren Aufbau ist dies nötig, da ansonsten die Gefahr besteht, dass eine Aggregation in Verbindung mit dem Verlust der eigentlichen Funktion des Proteins geschehen kann. Die Chaperone beschleunigen hierbei den Vorgang der korrekten Faltung und Assoziation der Proteine durch den Einsatz von nicht kovalenten Wechselwirkungen (Buchner, 2002; Wegele et al., 2004). Verschiedene Vertreter der Hitzeschockproteine, vor allem der HSP 70- und HSP 90-Gruppen, konnten als differentiell reguliert analysiert werden.

Für die HSP 70-Proteine konnte im oB das **Heat shock 70 kDa protein 5** (Hspa5) zum Zeitpunkt P7 als hochreguliert, im Ce hingegen als herunterreguliert identifiziert werden. Zudem konnte eine weitere Herunterregulation des Proteins im Ce zum Zeitpunkt P637 festgestellt werden. Das **Heat shock 70 kDa protein 1A/1B** (Hspa1a) ist im Vergleich mit P637 zum Zeitpunkt P90 nicht vorhanden (absent). Eine Hochregulation des **Heat shock cognate 71 kDa protein** (Hspa8) ist innerhalb des Co zum Zeitpunkt P7 und P637 im Vergleich mit P90 detektierbar. Die Gruppe der HSP 90-Proteine zeigt mit dem **Heat shock protein HSP 90-alpha** (Hsp90aa1) und **Heat shock protein HSP 90-beta** (Hsp90ab1) zwei Proteine, die zum Zeitpunkt P637 im Vergleich mit P90 hochreguliert innerhalb des oB feststellbar sind. Außerdem konnte das Mitglied **Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial** (Trap1) als herunterreguliert zum Zeitpunkt P7 wie auch P637 im Co identifiziert werden.

Bezüglich der hier aufgeführten sehr unterschiedlichen differentiellen Regulation der einzelnen Vertreter der Hitzeschockproteingruppen der HSP 70- und HSP 90-Proteine lässt sich keine klare Aussage über die funktionelle Bedeutung der Expressionsunterschiede im Vergleich der einzelnen Regionen und Alterstufen tätigen. Zwar konnte von Proctor und Lorimer (2011) gezeigt werden, dass bei der altersbedingten Neurodegeneration, welche sich unter anderem durch eine Akkumulation von aggregierten Proteinen und dem neuronalen Zelltod auszeichnet, eine Hochregulation von HSP 90-Proteinen erkennbar ist, jedoch wäre die hier analysierte, teilweise gegensätzliche Regulation einzelner Proteine zu spekulativ, um diese Aussage auf die hier erfassten Ergebnisse zu übertragen.

Als eine zweite Gruppe an Proteinen mit der Wirkungsweise von Chaperonen konnten einzelne Untereinheiten des TCP1 Komplexes als differentiell reguliert analysiert werden. Der Komplex dient hierbei der Faltung von Polypeptiden unter

Einsatz von ATP-Hydrolyse. So ist die Untereinheit ***T-complex protein 1 subunit epsilon*** (Cct5) innerhalb des oB zum Zeitpunkt P7 hochreguliert, innerhalb des Ce kann eine Hochregulation zu den Zeitpunkten P7 und P637 festgestellt werden. Des Weiteren konnte ***T-complex protein 1 subunit beta*** (Cct2) zum Zeitpunkt P637 im Vergleich mit P90 im oB als herunterreguliert und ***T-complex protein 1 subunit gamma*** (Cct3) im Ce als hochreguliert zum Zeitpunkt P637 analysiert werden.

Auch innerhalb dieser Gruppe der Chaperone ist die sehr unterschiedliche differentielle Regulation der einzelnen Untereinheiten des TCP1 Komplexes auffällig. So ist davon auszugehen, dass die verschiedenen Expressionsunterschiede beispielsweise nicht durch eine altersbedingte oder pathologische Ursache zu begründen sind, sondern durch Veränderungen innerhalb des Zytoskeletts verursacht werden. So konnte Chen et al. (1994) zeigen, dass dieser Komplex auch an der Kontrolle der korrekten Faltung der dynamisch regulierten Proteine Aktin und Tubulin beteiligt ist.

4.2.12 Strukturproteine

Die Strukturproteine, welche die Proteine für den Aufbau des Zytoskeletts beinhalten, sind für die neurale Entwicklung der Zelle von enormer Bedeutung. So ist dabei beispielsweise die dynamische Organisation des Zytoskeletts (Devaux et al., 2012), das axonale (Maurya et al., 2009), wie auch das Wachstum von Dendriten (Li et al., 2009) und die Etablierung synaptischer Kontakte (Kinoshita et al., 2000; Xue et al., 2004; Takamori et al., 2006) Gegenstand in der Expression der Mitglieder dieser funktionellen Proteingruppe. Insgesamt baut sich das Zytoskelett grundsätzlich aus drei Komponenten auf: den Aktin-Mikrofilamenten, den Mikrotubuli und den Intermediärfilamenten. Das Zusammenspiel dieser drei Komponenten bildet einen wichtigen Baustein bei Transportvorgängen und der mechanische Stabilisierung der Zellen (beispielsweise von Axonen und Synapsen) sowie im Zusammenspiel weiterer Proteine, dem Transport innerhalb der Neurons und dessen Beweglichkeit.

Das Zytoskelettprotein ***Actin, cytoplasmic 1*** (Actb) konnte innerhalb des oB zum Zeitpunkt P7, wie auch zum Zeitpunkt P637 als hochreguliert analysiert werden. Innerhalb des Co hingegen kann eine erhöhte Expression dieses Proteins im Vergleich zu P7 zum Zeitpunkt P90 beobachtet werden. Diese hier festgestellte differentielle Regulation und die damit verbundene dynamische Funktionsweise des Proteins kann durch dessen Wirkungsweise erklärt werden. So kann Aktin in zwei

unterschiedlichen Formen innerhalb der Zelle vorgefunden werden: G-Aktin beschreibt hierbei die globuläre monomere Form, wobei F-Aktin helikale Polymere formt. Beide Formen stellen hierbei flexible Strukturen dar, die innerhalb des dynamisch regulierten Aktin-Netzwerks eine wichtige Rolle einnehmen (Pernier et al., 2016). Aktin besitzt insgesamt vier Hauptfunktionen: Die Formung von Mikrofilamenten, d.h. die Ausbildung von polaren „Schienen“ für Kinesin Motorproteine (benötigt für z.B. den Vesikel- und Organellentransport), als Komponente des Zytoskeletts, den Einfluss auf die Zellmotilität durch (De-) Polymerisation von Fibrillen sowie innerhalb von Muskelzellen die Verbindung mit Myosin zur Formung von Actomyosin-Myofibrillen.

Actin-related protein 2 (Actr2) ist innerhalb des oB zum Zeitpunkt P7 hochreguliert, wobei **Actin-related protein 3** (Actr3) innerhalb des Ce im Vergleich mit P90 zu P7 hochreguliert ist. Diese Proteine fungieren als ATP-bindende Komponente des Arp2/3 Komplexes, welcher an der Regulation der Polymerisation von Aktin involviert ist und somit Einfluss auf die Formation des Aktin Netzwerks innerhalb der Zelle besitzt.

Des Weiteren konnte innerhalb des oB eine Hochregulation des **F-actin-capping protein subunit alpha-1** (Capza1) festgestellt werden. Innerhalb des Ce ist zudem das Protein **F-actin-capping protein subunit alpha-1** (Capza1) und **F-actin-capping protein subunit beta** (Capzb) im Vergleich mit P90 zu P7 hochreguliert. Die hier aufgeführten Proteine begrenzen das Wachstum der Enden von Aktinfilamenten durch Bindung von Ca^{2+} -Ionen.

Die Hochregulation dieser Proteine geht einher mit der im Vorangegangenen beschriebenen differentiellen Regulation des Aktins selbst. So wird auch anhand der differentiellen Regulation der hier aufgeführten Proteine die dynamische Struktur von Aktin deutlich. Insgesamt ist also nicht nur Aktin selbst für dessen Umbauvorgänge verantwortlich, sondern viel mehr auch die mit diesem Protein assoziierten aktinbindenden Makromoleküle (Medina et al., 2008).

Verschiedene Vertreter des Proteins Tubulin konnten außerdem differentiell reguliert innerhalb der untersuchten Regionen detektiert werden. So sind im oB die Proteine **Tubulin alpha-1A chain** (Tuba1a), **Tubulin beta-3 chain** (Tubb3) und **Tubulin beta 4A class IVa** (Tubb4) zum Zeitpunkt P637 gegenüber P90 hochreguliert. Im Ce wie

auch im Co weist das Protein ***Tubulin alpha-1C chain*** (Tuba1c) eine Herunterregulation zum Zeitpunkt P7 auf, wobei ***Tubulin beta-2B chain*** (Tubb2b) im Vergleich mit P90 innerhalb von P7 im Ce hochreguliert erscheint.

Tubuline sind für die Bildung von Mikrotubuli verantwortlich. So bestehen diese aus zylinderförmigen Röhren mit einem Durchmesser von 20-25 nm und sind aus Protofilamenten, bestehend aus α - und β -Tubulin Polymeren aufgebaut. Mikrotubuli selbst agieren als Gerüststruktur, um so die Form einer Zelle zu definieren und ermöglichen zudem für Zellorganellen und Vesikel mit Hilfe von Motorproteinen (Kinesin, Dynein) einen intrazellulären Transport. Innerhalb von neuronalem Gewebe kann dem Protein zudem eine zentrale Rolle in der Reifung zugeschrieben werden. So konnten Tischfield und Engle (2010) zeigen, dass das Protein und dessen Unterformen verschiedene intrazelluläre Aufgaben in der neuronalen Entwicklung sowohl im juvenilen, als auch adulten Tier besitzt. So ist es unter anderem an der Synaptogenese beteiligt (Bhattacharya et al., 1991), wobei auch in adulten Tieren eine erhöhte Expression des Proteins, beispielsweise durch Reparaturvorgänge innerhalb von Neuronen, ausgelöst werden kann (Guo et al., 2011). Insgesamt decken sich die Ergebnisse der differentiellen Regulation dieses Proteins so mit den Resultaten der hier aufgeführten Studien.

Verschiedene Vertreter der Dihydropyrimidinase-Like Proteine können außerdem als eine in dieser Gruppe differentiell regulierte Kollapsin-Antwort Mediator Proteinfamilie analysiert werden. So stellen diese funktionell Makromoleküle dar, die einen Einfluss auf neuronale Netzwerke, deren Wachstum und Polarität besitzen. Eine Unterstützung des Zusammenbaus von Mikrotubuli, Sema3A (Semaphorin III)-induzierten Veränderungen des axonalen Wachstumskegels sowie den Effekt auf die synaptische Signalweiterleitung durch Interaktion mit Kalzium-Kanälen sind hierbei die Hauptmerkmale dieser Proteine.

Innerhalb des oB konnten mehrere Vertreter dieser Proteine differentiell reguliert nachgewiesen werden. ***Dihydropyrimidinase-related protein 2*** (Dpysl2), wie auch ***Dihydropyrimidinase-related protein 3*** (Dpysl3) und ***Dihydropyrimidinase-related protein 5*** (Dpysl5) sind hier zum Zeitpunkt P7 hochreguliert, wobei innerhalb des Co das Protein ***Dihydropyrimidinase-related protein 1*** (Crmp1) zum Zeitpunkt P7 eine Hochregulation erfahren hat.

Wie auch Yoshimura et al. (2005) zeigen konnten, spielen die Dihydropyrimidinase-Like-Proteine eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Ausreifung von Neuronen sowie innerhalb des Axonenwachstums. Die in allen hier untersuchten Regionen festgestellte Hochregulation der verschiedenen Formen des Proteins lässt sich somit durch eine verstärkte Ausbildung von neuronalen Komponenten, wie z.B bei der synaptischen Signalweiterleitung benötigt, innerhalb der Zelle begründen.

Zudem konnten Vertreter der Neurofilamentfamilie mit unterschiedlicher Regulation nachgewiesen werden. **Neurofilament light polypeptide** (Nefl) sowie **Neurofilament medium polypeptide** (Nefm) sind in allen drei Regionen (oB, Ce, Co) im Vergleich mit P90 zum Zeitpunkt P7 in einer herunterregulierten Form vorliegend. Auch die in den Ergebnissen aufgeführte Western Blot Analyse spiegelt diese differentielle Expression innerhalb des oB wieder. Insgesamt gehören die Neurofilamente zu den Typ IV Intermediärfilamenten. Diese lassen sich wiederum in Proteine, bestehend aus leichten (Nefl), mittleren (Nefm) und schweren (Nefh) heteropolymeren Ketten unterteilen. Funktionell wird ihnen eine Rolle im axonalen Wachstum, neuronaler Polarität und der axonalen Signalweiterleitung zugeschrieben (Maurya et al., 2009). Wie von Riederer et al. (1996) veröffentlicht, können Unterschiede in der Regulation während der Ontogenese auftreten, wobei hier zwischen verschiedenen Zelltypen und deren differentieller Expression unterschieden werden muss. So konnte im Ce von Katzen gezeigt werden, dass innerhalb der Rindenschicht afferente Moos- und Kletterfasern bereits zur Geburt Nefl und Nefm aufweisen. Hingegen konnte in anderen Zelltypen eine sich hierzu unterscheidende Expression der Proteine beobachten lassen. So zeigten die Axone der Korbzellen eine Expression dieser Proteine erst nach einem Monat postnatal, wobei sie innerhalb der Parallelfasern erst zu Beginn des dritten Monats nachgewiesen werden konnten. Somit kann diese Arbeit eine Erklärung bieten, warum die Proteine eine erhöhte differentielle Expression nach P7 zeigen, da nicht zwischen den unterschiedlichen zellulären Geweben differenziert wurde.

α -Internexin (Ina) ist innerhalb des Ce wie auch des Co zum Zeitpunkt P7 als herunterreguliert analysierbar. Dieses Protein wird außerdem zu der Familie der Intermediärfilamente (Typ IV) gezählt. Normalerweise ist die Expression dieses Proteins in der Embryonalphase am höchsten (E16 stellt das Maximum der Expression dar) und nimmt anschließend bis zum Erwachsenenalter ab (Liu et al.,

2006). Jedoch konnte von Yuan et al. (2006) gezeigt werden, dass innerhalb des adulten Tieres dieses Protein vor allem in der Regulation des neurofilamentären Systems beteiligt ist, welches sich somit auch durch die in dieser Studie detektierten Befunde belegen lässt.

Glial fibrillary acidic protein (Gfap) ist ein Protein, das vor allem in adulten Astrozyten für die Produktion von Intermediärfilamenten zuständig ist (Liem und Messing, 2009). Auch in dieser Arbeit kann eine dementsprechende differentielle Expression des Proteins festgestellt werden. So zeigt sich innerhalb des oB und Co eine Hochregulation dieses Proteins zum Zeitpunkt P637. Gleichzeitig ist das Protein innerhalb des Ce und Co zum Zeitpunkt P7 herunterreguliert.

Einzelne Vertreter der Septin-Proteinfamilie zeigen außerdem eine unterschiedliche Regulation im Vergleich der verschiedenen Altersstufen. Diese Proteine stellen GTP-bindende Makromoleküle dar, die bei der Kontrolle und Regulation von zellulären Prozessen zur Formung von Filamenten beitragen bzw. involviert sind. In der Literatur werden diese Proteine aufgrund ihrer filamentösen Form, wie auch ihrer Assoziation mit Zellmembranen, Aktinfilamenten sowie Mikrotubuli als zytoskelettale Komponenten bezeichnet. Die Septinfilamente besitzen hierbei keine polare Form, sondern sind im Aufbau mit Intermediärfilamenten vergleichbar (Mostowy und Cossart, 2012).

Septin-6 (Sept6) zeigt zum Zeitpunkt P637 im oB eine Herunterregulation, wobei innerhalb des Co eine Herunterregulation zum Zeitpunkt P7 festgestellt werden kann. **Septin-8** (Sept8) ist innerhalb des oB und Co zum Zeitpunkt P7 herunterreguliert und im Co zusätzlich zum Zeitpunkt P637 herunterreguliert. Des Weiteren konnte eine Herunterregulation von **Septin-11** (Sept11) zum Zeitpunkt P7 wie auch P637 im oB nachgewiesen werden. Insgesamt deutet dies somit auf ein hauptsächliches Vorkommen dieser Proteine zum Zeitpunkt um P90 herum hin. Wie einleitend beschrieben, können durch die unterschiedliche Regulation der einzelnen Mitglieder dieser Proteinfamilie deren dynamische Eigenschaften, beispielsweise in der Beeinflussung der Verzweigung und Synthese von Dendriten (Cho et al., 2011) belegt werden. Zudem kann für Sept11 eine Rolle in der GABAergen synaptischen Konnektivität, speziell hierbei in der Postsynapse, sowie eine erhöhte Konzentration innerhalb der dendritischen Dornfortsätze im Gehirn nachgewiesen werden (Li et al., 2009).

Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (Marcks) ist innerhalb des oB wie auch des Ce zum Zeitpunkt P7 in hochregulierter Form gegenüber P90 analysierbar. Zudem kann eine erhöhte Expression dieses Proteins im oB zum Zeitpunkt P637 festgestellt werden. Das Protein bildet funktionell ein Substrat für die Proteinkinase C, wobei es gleichzeitig an der Vernetzung von Aktinfilamenten beteiligt ist. Eine Bindung mit Kalzium hingegen wirkt der Assoziation mit Aktin innerhalb der Plasmamembran entgegen. Außerdem kann eine Bindung des Proteins mit Calmodulin und Synapsin nachgewiesen werden. Im adulten Gehirn ist das Protein in die Regulation der Zelladhäsion und Neurosekretion innerhalb der Axonterminalen und dendritischen Verzweigungen involviert, wobei eine erhöhte Expression zu einer Verstärkung der dendritischen Komplexität führt (Li et al., 2008). Dies könnte auch ein Beleg dafür sein, dass eine erhöhte Regulation dieses Proteins in den Entwicklungszeitpunkten P90 und P637 dieser Studie nachweisbar ist.

Stathmin (Stmn1) ist im oB wie auch im Ce zum Zeitpunkt P7 in hochregulierter Form vorliegend. Dieses Protein stellt ein zytosolisches Phosphoprotein dar, welches funktionell als ein intrazellulärer Regulator des Mikrotubulifilamentsystems fungiert. Hierbei kann es destabilisierend auf den Auf- bzw. Abbau der Mikrotubuli wirken. Auch von Ohkawa et al. (2007) konnte in Purkinjezellen des Ce der Maus zum Zeitpunkt P10 und P20 gezeigt werden, dass durch Herabregulation des Proteins eine Ausbildung des Dendritenwachstums verstärkt wird, da Stmn1 hierbei eine inhibierende Funktion auf die Ausbildung der Dendritenreifung besitzt.

4.2.13 Transportproteine

Vesicle-fusing ATPase (Nsf) ist innerhalb des oB wie auch des Co zum Zeitpunkt P7 herunterreguliert. Dieses Protein wird für den Vesikel-vermittelten Transport benötigt. Hierbei katalysiert es die Fusion von Transportvesikeln mit den Golgi-Zisternen, wobei auch ein Transport seitens des endoplasmatischen Retikulums in Richtung des Golgi-Apparats mit Hilfe dieses Proteins ermöglicht wird. Auch bei dem Transport zwischen verschiedenen Membrankompartimenten wird dieses Protein benötigt. Mit dem Einsatz von SNARE-Proteinen wird hierbei ein fester Kontakt zwischen dem Vesikel und der Ziel-Membran geschaffen, sodass es zur Fusion zwischen beiden Komponenten kommt. Es wird angenommen, dass Nsf die hierbei entstandenen SNARE-Komplexe mit Hilfe von ATP-Hydrolyse auflöst, nachdem die Membranfusion stattgefunden hat (Alberts, 2008). Da bei der Freisetzung von

Neurotransmittern an einer Synapse die Fusion von synaptischen Vesikeln mit der Membran benötigt wird, stellt NSF auch hierbei ein Schlüsselprotein dar. So konnten Noel et al. (1999) zeigen, dass NSF beispielsweise mit einer direkten Bindung an GluR2, eine Untereinheit des AMPA-Typ Glutamat Rezeptors, eine synaptische Funktion besitzt. Die Herunterregulation des Proteins im oB wie auch im Co innerhalb der Analyse dieser Arbeit deutet darauf hin, dass es an dem Aufbau des Netzwerks im ZNS beteiligt ist.

Beta-soluble NSF attachment protein (Napb) ist innerhalb des oB und Co zum Zeitpunkt P7 herunterreguliert, wobei zudem eine Herunterregulation des Proteins zum Zeitpunkt P637 innerhalb des Co detektiert werden konnte. Dieses Protein gehört zur Gruppe der NSF-attachement proteins (SNAPs), welche für die Membranfusion und den Vesikeltransport zuständig sind. Innerhalb der Mammalia kommen insgesamt drei Isoformen dieses Proteins (α -, β - und γ -SNAP) vor, wobei β -SNAP die gehirnspezifische Isoform darstellt. Napb fusioniert hierbei mit der Membran, nachdem es an den SNARE-Komplex gebunden hat und formt so einen heterooligomeren Komplex, bis dieser durch die Hydrolyse von ATP seitens Nsf gelöst wird (Stenbeck, 1998). In Kombination mit dem vorab vorgestellten Protein Nsf scheint somit auch dieses Protein im Zusammenspiel für die Regulation der synaptischen Funktion von Neuronen und der Neurogenese von Wichtigkeit zu sein.

Verschiedene Vertreter der „Fatty acid-binding proteins-Familie“ konnten als differentiell exprimiert analysiert werden. So ist **Fatty acid-binding protein, brain** (Fabp7) innerhalb des oB wie auch des Ce zum Zeitpunkt P7 gegenüber P90 hochreguliert. Zusätzlich konnte eine Hochregulation des **Fatty acid-binding protein, epidermal** (Fabp5) zum Zeitpunkt P7 innerhalb des oB nachgewiesen werden. Das Vorkommen von Fabp5 konnte in epidermalen Zellen nachgewiesen werden, wo es im Allgemeinen eine Rolle in der Aufnahme, dem Transport und Metabolismus von Fettsäuren spielt. Zudem konnte von Allen et al. (2001) gezeigt werden, dass eine differentielle Hochregulation dieses Proteins innerhalb der Pyramidenzellen des Co, den Purkinjezellen des Ce sowie Neuronen des oB in verstärktem Maße zur Neurogenese und Migration von Neuronen in der postnatalen Phase führt. Fabp7 (gehirnspezifisch) wird eine potentielle Funktion bei der Entwicklung des ZNS zugeschrieben. So wird dieses beispielsweise für das radiale Glia-Fasersystem benötigt, um hier die Migration von neu produzierten Neuronen in

den kortikalen Schichten zu ermöglichen (Anthony et al., 2005; Keilani und Sugaya, 2008). Anhand der hier aufgeführten Befunde kann somit davon ausgegangen werden, dass auch diese Proteine relevant für die Entwicklung und Funktion des sich entwickelnden Gehirns sind.

Verschiedene Mitglieder der „Voltage-Dependent Anion Channel Familie“ konnten außerdem als differentiell reguliert nachgewiesen werden. So zeigte das **Voltage-dependent anion-selective channel protein 1** (Vdac1) innerhalb des Ce wie auch des Co eine Herunterregulation zum Zeitpunkt P7 und P637. **Voltage-dependent anion-selective channel protein 2** (Vdac2) konnte außerdem als herunterreguliert zum Zeitpunkt P7 innerhalb der drei untersuchten Regionen oB, Ce und Co nachgewiesen werden. Die Proteine sind spannungsabhängige Porine mit Anionenkanälen, die einen der Hauptwege für metabolische Diffusion von kleinen hydrophilen Molekülen innerhalb der äußeren Mitochondrienmembran darstellen. Zudem besitzen sie die Eigenschaft mitochondriale Produkte auszuscheiden, die apoptotische Vorgänge induzieren können. Imada et al. (2010) konnten zeigen, dass durch die Inhibierung dieser Proteine eine Erhöhung der Proliferation von oligodendrozytischen Vorläuferzellen induziert werden kann. Somit könnte diese Erkenntnis ein Hinweis liefern, warum eine Herunterregulation dieser Proteine in der frühen postnatalen Phase P7 und der damit in diesem Zeitraum verbundenen Neurogenese innerhalb der untersuchten Gebiete gegeben ist.

Unterschiedliche Vertreter bzw. Untereinheiten des Dynactin/Dynein Aktivator Komplexes (**Alpha-centractin** (Actr1a), **Dynactin subunit 2** (Dctn2), (**Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2** (Dync1i2)) konnten differentiell reguliert nachgewiesen werden. Actr1a ist dabei innerhalb des oB wie auch des Co zum Zeitpunkt P7 hochreguliert, wobei Dctn2 eine Hochregulation zum Zeitpunkt P7 im Ce zeigt. Dync1i2 ist jeweils innerhalb des oB zum Zeitpunkt P7 hochreguliert und innerhalb des Ce zeigt es zum Zeitpunkt P7 und P637 eine Herunterregulation.

Während Actr1a und Dctn2 Untereinheiten für das Protein Dynactin darstellen und die Fähigkeit besitzen, an Mikrotubuli wie auch an das Protein Dynein zu binden, erfüllen sie zahlreiche unterschiedliche Funktionen wie z.B. Transportaufgaben, Spindelformationsänderungen und nehmen an der Axogenese teil. Dync1i2 stellt dabei eine nicht-katalytische Komponente des zytoplasmatischen Dynein 1 Komplexes dar, wobei es hierbei in der Verbindung von Dynein zu Cargo- und

Dynein regulierenden Adapterproteinen beteiligt ist. Insgesamt kann anhand der Regulationsanalyse von einer Hochregulation der beschriebenen Vertreter des Dynactin/Dynein Aktivator Komplexes zum Zeitpunkt P7 ausgegangen werden. Eine Begründung hierfür könnte in der erhöhten Aktivität dieser Proteine in der frühen Entwicklungsphase P7 durch Etablierung und Ausbildung verschiedener Komponenten für den Aufbau des Zytoskeletts, der Axogenese und den damit einhergehenden Transportvorgängen mit Hilfe der Mikrotubuli liegen. Die Befunde der differentiellen Regulationsanalyse der Strukturproteine unterstützen hierbei diese Annahme. Zudem konnten auch Sakakibara et al. (2013) in einer Studie zeigen, dass die Mikrotubuli und die damit einhergehende Aktivität der Motorproteine Dynactin und Dynein essentiell für die neuronale Morphogenese innerhalb des sich entwickelnden Gehirns ist.

5. Ausblick

Anhand der Analyse der differentiellen Proteinexpression des oB, Ce und Co zu unterschiedlichen Zeitpunkten (P7, P90, P637) konnte innerhalb dieser Studie festgestellt werden, dass es in den genannten Gebieten zu einer differentiellen Expression von Proteinen kommt, die einen Einfluss auf das Mikromilieu von Zellpopulationen des ZNS besitzen. Dies beinhaltet zahlreiche Unterschiede in der Proteinexpression, einschließlich der Hoch- und Herunterregulation von einzelnen Proteinen oder auch dem Auftreten von Proteinen zu spezifischen Entwicklungszeiträumen.

Hierbei ist es jedoch wichtig zu bedenken, dass mittels der differentiellen 2D-Spotanalyse nur Unterschiede erfasst werden können, die sich innerhalb einzelner zu vergleichender Spots befinden. So kann man mit den hier angewandten Methoden nicht Veränderungen detektieren, die von Isoformen und/oder posttranslationalen Veränderungen hervorgerufen werden. So konnten anhand der Ergebnisse Proteine identifiziert werden, die beispielsweise in einer bestimmten Entwicklungsstufe als fehlend dargestellt werden, normalerweise aber zu diesem Zeitpunkt in hoher Menge innerhalb der Zelle vorhanden sind. Der Grund hierfür könnte sich in dem eventuellen Vorkommen von solchen posttranslationalen Modifikationen erklären lassen. Zudem zeigen viele Proteine spezifische Regulationsveränderungen zwar innerhalb eines Spots, diese gelten aber nicht für das gesamte Protein.

Insgesamt war das Ziel dieser Arbeit jedoch nicht die strukturellen Differenzen eines einzelnen Proteins innerhalb verschiedener Spots zu charakterisieren, sondern Proteine zu finden, die eine Veränderung in ihrer Menge erfahren haben und somit einen Indikator für eventuelle Unterschiede in der Proteinexpression während der Entwicklung darstellen.

Um eine genaue Aussage über vorhandene Expressionsunterschiede einzelner Proteine zu tätigen, muss hierfür in weiteren Studien sichergestellt werden, dass hierbei alle individuellen Spots des Proteins detektiert werden, um so die individuelle differentielle Regulation erfassen zu können. Dies beinhaltet zudem auch die Spots, welche beispielsweise innerhalb des Gels in den Regionen lokalisiert sind, die eine deutlich geringere Auflösung besitzen. So erlaubt die Separationstechnik, die in dieser Studie verwendet wurde, eine eindeutige Proteinauftrennung innerhalb eines

Bereiches von ca. 10-100 kDa bzw. einem pH-Bereich zwischen 3-10. Daher ist es zwar möglich einen bestimmten Anteil, nicht jedoch das komplette Proteom der untersuchten Regionen zu analysieren (Becker et al., 2006). Des Weiteren zeigen manche Anteile der Gele eine geringere Auflösung, was zusätzlich zu Fehlinterpretationen gewisser Proteinspots beitragen kann.

Innerhalb dieser Studie wurden bei der Verwendung des SVQs ($SVQ \leq 0,6$; $SVQ \geq 1,67$) Zeitpunkte innerhalb der Entwicklung der Ratte gewählt, die einen minimalen Einblick in die dynamische Veränderung des Proteoms der unterschiedlichen Gehirnregionen erlauben. Daher wäre es von Vorteil in zukünftigen Studien weitere Zeitpunkte (z.B. P0, P20, P70, P200) bzw. höhere SVQ-Bereiche zu wählen, um so eine detailliertere Einsicht in die Entwicklung der einzelnen Gehirnregionen zu erlangen. Zudem könnte mit der Verwendung von zusätzlichen Methoden (z.B. Differenz-Gelelektrophorese, „DIGE“) und der Validierung von Regulationsunterschieden weiterer Proteine mittels Western Blot Analyse und Immunhistochemie eine Erhöhung der Sensitivität sowie der Reproduzierbarkeit der Probenanalyse erreicht werden. Dies ist in Anbetracht einzelner beobachteter Unterschiede in der statistischen Auswertung mit Hilfe der „multi condition coverage method“ sowie des „Mann-Whitney *U*-Tests“ dieser Arbeit angebracht. Darüber hinaus könnte durch die Verwendung zusätzlicher massenspektrometrischer Methoden, wie beispielsweise der „SIRMS“ (stable isotope ratio mass spectrometry) beides, sowohl die Identifikation des Proteins an sich als auch die Detektion unterschiedlich ausgebildeter Varianten verbessern. Auch die Verwendung von Affinitätsanreicherungs-MS-Methoden (z.B. IDBEST™, iTRAQ™) würde die Wahrscheinlichkeit erhöhen, gering vorhandene Proteine zu markieren und so deren differentielle Expression sichtbar zu machen (Schneider und Hall, 2005). Eine zusätzliche Verwendung von Aufreinigungsprotokollen kann zudem Möglichkeiten bieten, eine detaillierte Einsicht in die differentielle Regulation speziell von kleinen Proteinen (z.B. Neurotransmittern oder auch Plasmamembranproteinen) zu erlangen.

6. Beantwortung der Fragestellung

Im Folgenden wird die in der Einleitung formulierte Fragestellung aufgeführt und unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit auf die Beantwortung der einzelnen Teilfragen eingegangen.

1. Gibt es Unterschiede in der Expression innerhalb der funktionellen Proteingruppen im Vergleich der unterschiedlichen Gehirnareale?

Es konnten anhand der differentiellen Expressionanalyse der verschiedenen Einzelproteine, wie auch der funktionellen Proteinklassen, Unterschiede in der quantitativen Verteilung der differentiell regulierten Proteine innerhalb der drei untersuchten Regionen (oB, Ce, Co) und den jeweiligen Zeitpunkten (P7, P90, P637) festgestellt werden.

2. Sind Expressionsmuster analysierbar, die in allen drei Gehirnregionen in gleicher Form auffindbar sind?

Es ließ sich anhand der Identifikation von einzelnen Proteinen, wie auch durch die Analyse der Proteingruppen als Ganzes, feststellen, dass auch Gemeinsamkeiten zwischen den einzelnen Regionen hinsichtlich der Regulation von Proteinen gegeben sind. Beispiele hierfür sind Vertreter des Kohlenhydrat- und Aminosäuremetabolismus, regulatorische und Strukturproteine sowie Proteine der Biosynthese.

3. Ist eine Identifizierung von Proteinen möglich, die an neuronalen Proliferations-, Migrations- oder Differenzierungsvorgängen beteiligt sind?

Es konnte eine Reihe von Proteinen identifiziert werden, die im neonatalen Rattengehirn Differenzierungs-, Migrations- und Proliferationsvorgänge ermöglichen und regulieren. Des Weiteren konnten auch zum Zeitpunkt P637 Proteine analysiert werden, die für die Aufrechterhaltung des neuronalen Netzwerks benötigt werden. Speziell Vertreter der Proteinkategorien des Kohlenhydratmetabolismus (beispielsweise *Gamma-Enolase* (Eno2), *Fructose-bisphosphate Aldolase C* (Aldoc)), regulatorische Proteine (z.B. *Neuromodulin* (Gap43)) und Proteine des Energiemetabolismus (Vertreter der NADH Dehydrogenase-Familie) scheinen eine wichtige Rolle bei der Etablierung der Neurogenese zu spielen. Des Weiteren

konnten zusätzliche Proteine identifiziert werden, die außerdem eine differentielle Regulation zu den untersuchten Zeitpunkten innerhalb der Gehirnareale des oB, Ce und Co zeigen und direkt in die Architektur des Zytoskeletts involviert sind. Neben der Kategorie der Strukturproteine und deren Vertreter (z.B. Dihydropyrimidinase-related Proteine (Dpysl3, Dpysl5, Crmp1), Neurofilamente (Nefm, Nefl) sowie *Stathmin* (Stmn1) und *Drebrin* (Dbn1)) sind auch hier die Transportproteine (Untereinheiten des Dynactin/Dynein Aktivator Komplexes (*Alpha-centractin* (Actr1a), *Dynactin subunit 2* (Dctn2), *Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2* (Dync1i2) sowie beispielsweise *Vesicle-fusing ATPase* (Nsf)) entscheidend für die Axo- und Synaptogenese.

7. Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

Adams RJ (1996) Metaphase spindles rotate in the neuroepithelium of rat cerebral cortex. *J Neurosci.* 16: 7610-8.

Adlard BP, Dobbing J, Sands J (1975) A comparison of the effects of cytosine arabinoside and adenine arabinoside on some aspects of brain growth and development in the rat. *Br J Pharmacol.* 54: 33-9.

Aghajanian GK, Bloom FE (1967) The formation of synaptic junctions in developing rat brain: a quantitative electron microscopic study. *Brain Res.* 6: 716-27.

Alberts B (2008) Molecular biology of the cell. *Garland Science*; ISBN: 978-0815341055.

Allen GW, Liu J, Kirby MA, De León M (2001) Induction and axonal localization of epithelial/epidermal fatty acid-binding protein in retinal ganglion cells are associated with axon development and regeneration. *J Neurosci Res.* 66: 396-405.

Altman J (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 137: 433-57.

Altman J (1982) Morphological development of the rat cerebellum and some of its mechanisms. *Exp. Brain Res.* 6: 8-49.

Altman J, Bayer SA (1997) Development of the cerebellar system in relation to its Evolution, Structure and Functions. *CRC Press, USA*; ISBN: 978-0849394904.

Andreopoulos S, Li PP, Warsh JJ (1995) Developmental expression of G alpha o and G alpha s isoforms in PC12 cells: relationship to neurite outgrowth. *Brain Res Dev Brain Res.* 88: 30-6.

Angevine JB Jr, Sidman RL (1961) Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature.* 192: 766-8.

Anthony TE, Mason HA, Gridley T, Fishell G, Heintz N (2005) Brain lipid-binding protein is a direct target of Notch signaling in radial glial cells. *Genes & Development.* 19: 1028-33.

- Antonino LC, Wu JC (1994) Human IMP dehydrogenase catalyzes the dehalogenation of 2-fluoro- and 2-chloroinosine 5'-monophosphate in the absence of NAD. *Biochemistry*. 33: 1753-9.
- Attwell D, Laughlin SB (2001) An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 21: 1133-45.
- Bandeira F, Lent R, Herculano-Houzel S (2009) Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 106: 14108-13.
- Bayer SA (1983) 3H-thymidine-radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulb. *Exp Brain Res*. 50: 329-40.
- Bayés A, Grant SG (2009) Neuroproteomics: understanding the molecular organization and complexity of the brain. *Nat Rev Neurosci*. 10: 635-46.
- Becker M, Schindler J, Nothwang HG (2006) Neuroproteomics - the tasks lying ahead. *Electrophoresis*. 27: 2819-29.
- Benowitz LI, Apostolides PJ, Perrone-Bizzozero N, Finklestein SP, Zwiers H (1988) Anatomical distribution of the growth-associated protein GAP-43/B-50 in the adult rat brain. *J Mol Neurosci*. 8: 339-52.
- Benowitz LI, Lewis ER (1983) Increased transport of 44,000- to 49,000-dalton acidic proteins during regeneration of the goldfish optic nerve: a two-dimensional gel analysis. *J Neurosci*. 3: 2153-63.
- Benowitz LI, Shashoua VE, Yoon MG (1981) Specific changes in rapidly transported proteins during regeneration of the goldfish optic nerve. *J Neurosci*. 1: 300-7.
- Berchter M, Meister J, Hammes C (1997) MALDI-TOF-MS: Eine neue analytische Technik zur Charakterisierung von Produkten auf Basis nachwachsender Rohstoffe. *Fett/Lipid*. 99: 384-91.
- Bertoni-Freddari C, Giuli C, Pieri C, Paci D (1986) Age-related morphological rearrangements of synaptic junctions in the rat cerebellum and hippocampus. *Arch Gerontol Geriatr*. 5: 297-304.

Bhattacharya B, Saha S, Sarkar (1991) PK Post-transcriptional regulation of tubulin mRNA in developing rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 10: 347-50.

Bradley MO, Hayflick L, Schimke RT (1976) Transformation, and amino acid analogs (WI-38). Effects of aging, viral protein degradation in human fibroblasts. *J Biol Chem.* 251: 3521-9.

Broadie K, Rushton E, Skoulakis EM, Davis RL (1997) Leonardo, a Drosophila 14-3-3 protein involved in learning, regulates presynaptic function. *Neuron.* 19: 391-402.

Buchner J (2002) Introduction: the cellular protein folding machinery. *Cell Mol. Life Sci.* 59: 1587-88.

Bulliard C, Zurbriggen R, Tornare J, Faty M, Dastoor Z, Dreyer JL (1997) Purification of a dichlorophenol-indophenol oxidoreductase from rat and bovine synaptic membranes: tight complex association of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoform, TOAD64, enolase-gamma and aldolase C. *Biochem J.* 324: 555-63.

Bunik VI, Kabysheva MS, Klimuk EI, Storozhevykh TP, Pinelis VG (2009) Phosphono analogues of 2-oxoglutarate protect cerebellar granule neurons upon glutamate excitotoxicity. *Ann N Y Acad Sci.* 1171: 521-9.

Buonomano DV, Merzenich MM (1998) Cortical plasticity: from synapses to maps. *Annu Rev Neurosci.* 21: 149-86.

Caley DW, Maxwell DS (1968) An electron microscopic study of neurons during postnatal development of the rat cerebral cortex. *J Comp Neurol.* 133: 17-44.

Cayre M, Canoll P, Goldman JE (2009) Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. *Prog Neurobiol.* 88: 41-63.

Cheng A, Hou Y, Mattson MP (2010) Mitochondria and neuroplasticity. *ASN Neuro.* 2.

Chen PC, Bhattacharyya BJ, Hanna J, Minkel H, Wilson JA, Finley D, Miller RJ, Wilson SM (2011) Ubiquitin homeostasis is critical for synaptic development and function. *J Neurosci.* 31:17505-13.

- Chen S, Synowsky S, Tinti M, MacKintosh C (2011) The capture of phosphoproteins by 14-3-3 proteins mediates actions of insulin. *Trends Endocrinol Metab.* 22: 429-436.
- Chen X, Sullivan DS, Huffaker TC (1994) Two yeast genes with similarity to TCP-1 are required for microtubule and actin function in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 9111-5.
- Cho SJ, Lee H, Dutta S, Song J, Walikonis R, Moon IS (2011) Septin 6 regulates the cytoarchitecture of neurons through localization at dendritic branch points and bases of protrusions. *Mol Cells.* 32: 89-98.
- Cicin-Sain L, Simaga S, Froebe A, Abramić M (2008) Central aminopeptidase and serotonin system activities: possible relationship. *Neuropeptides.* 42: 435-40.
- Clark WE, Meyer M (1947) The terminal connexions of the olfactory tract in the rabbit. *Brain.* 70: 304-28.
- Console-Bram LM, Fitzpatrick-McElligott SG, McElligott JG (1996) Distribution of GAP-43 mRNA in the immature and adult cerebellum: A role for GAP-43 in cerebellar development and neuroplasticity. *Dev. Brain Res.* 95: 97-106.
- Cunningham ML, Mac Auley A, Mirkes PE (1994) From gastrulation to neurulation: transition in retinoic acid sensitivity identifies distinct stages of neural patterning in the rat. *Dev Dyn.* 3: 227-41.
- De Gandarias JM, Irazusta J, Gil J, Fernández D, Varona A, Casis L (1999) Ontogeny of puromycin-sensitive and insensitive aminopeptidase activities in several subcellular fractions of the rat brain. *Brain Res Bull.* 50: 283-90.
- Devaux S, Poulain FE, Devignot V, Lachkar S, Irinopoulou T, Sobel A (2012) Specific serine-proline phosphorylation and glycogen synthase kinase 3 β -directed subcellular targeting of stathmin 3/Sclip in neurons. *J. Biol. Chem.* 287: 22341-53.
- Domon B, Aebersold R (2006) Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science.* 312: 212-17.
- Doremus TL, Varlinskaya EI, Spear LP (2004) Age-related differences in elevated plus maze behavior between adolescent and adult rats. *Ann N Y Acad Sci.* 1021: 427-30.

Eayrs JT, Goodhead B (1959) Postnatal development of the cerebral cortex in the rat. *J Anat.* 93: 385-402.

Edmondson JC, Hatten ME (1987) Glial-guided granule neuron migration in vitro: a high-resolution time-lapse video microscopic study. *J Neurosci.* 7: 1928-34.

English JD, Sweatt JD (1997) A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation. *J Biol Chem.* 272: 19103-06.

Eschbach J, Sinniger J, Bouitbir J, Fergani A, Schlagowski AI, Zoll J, Geny B, Rene F, Larmet Y, Marion V, Baloh RH, Harms MB, Shy ME, Messadeq N, Weydt P, Loeffler JP, Ludolph AC, Dupuis L (2013) Dynein mutations associated with hereditary motor neuropathies impair mitochondrial morphology and function with age. *Neurobiol Dis.* 58: 220-30.

Federico A, Cardaioli E, Da Pozzo P, Formichi P, Gallus GN, Radi E (2012) Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *J Neurol Sci.* 322: 254-62.

Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science.* 246: 64-71.

Finlay BL, Darlington RB (1995) Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains. *Science.* 268: 1578-84.

Föcking M, Boersema PJ, O'Donoghue N, Lubec G, Pennington SR, Cotter DR, Dunn MJ (2006) 2-D DIGE as a quantitative tool for investigating the HUPO Brain Proteome Project mouse series. *Proteomics.* 6: 4914-31.

Freeman JA, Bock S, Deaton M, McGuire B, Norden JJ, Snipes GJ (1986) Axonal and glial proteins associated with development and response to injury in the rat and goldfish optic nerve. *Exp Brain Res.* 13: 34-47.

Gardino AK, Yaffe MB (2011) 14-3-3 proteins as signaling integration points for cell cycle control and apoptosis. *Semin Cell Dev Biol.* 22: 688-95.

Gelfand VI, Bershadsky AD (1991) Microtubule dynamics: mechanism, regulation, and function. *Annu Rev Cell Biol.* 7: 93-116.

Gerdin AK (2010) The Sanger Mouse Genetics Programme: high throughput characterisation of knockout mice. *Acta Ophthalmologica.* 88: 925-7.

Gesteland RC, Sigwart CD (1977) Olfactory receptor units—a mammalian preparation. *Brain Res.* 133: 144-9.

Ghez C, Fahn S (1985) The cerebellum. In: Kandel E.R., Schwartz J.H., editors. Principles of Neural Science. *Elsevier; New York, USA*; ISBN: 978-0071390118.

Giambanco I, Verzini M, Donato R (1993) Annexins V and VI in rat tissues during post-natal development: immunochemical measurements. *Biochem Biophys Res Commun.* 196: 1221-6.

Girgis M, Goldby F (1967) Secondary olfactory connexions and the anterior commissure in the coypu, *Myocastor coypus*. *J Anat.* 101: 33-44.

Görg A, Postel W, Westermeier R (1978) Ultrathin-layer isoelectric focusing in polyacrylamide gels on cellophane. *Anal Biochem.* 89: 60-70.

Guo J, Qiang M, Ludueña RF (2011) The distribution of β -tubulin isotypes in cultured neurons from embryonic, newborn, and adult mouse brains. *Brain Res.* 1420: 8-18.

Gurniak CB, Perlas E, Witke W (2005) The actin depolymerizing factor n-cofilin is essential for neural tube morphogenesis and neural crest cell migration. *Dev. Biol.* 278: 231-41.

Guthrie KM, Gall C (2003) Anatomic mapping of neuronal odor responses in the developing rat olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 455: 56-71.

Haas SJ, Petrov S, Kronenberg G, Schmitt O, Wree A (2008) Orthotopic transplantation of immortalized mesencephalic progenitors (CSM14.1 cells) into the substantia nigra of hemiparkinsonian rats induces neuronal differentiation and motoric improvement. *J Anat.* 212:19-30.

Hamada-Kanazawa M, Narahara M, Takano M, Min KS, Tanaka K, Miyake M (2011) β -Citryl-L-glutamate acts as an iron carrier to activate aconitase activity. *Biol Pharm Bull.* 34: 1455-64.

Hatten ME (1990) Riding the glial monorail: a common mechanism for glial-guided neuronal migration in different regions of the developing mammalian brain. *Trends Neurosci.* 13: 179-84.

Hattori T, Takei N, Mizuno Y, Kato K, Kohsaka S (1995) Neurotrophic and neuroprotective effects of neuron-specific enolase on cultured neurons from embryonic rat brain. *Neurosci Res.* 21: 191-8.

Hebb DO (1949) *The Organization of Behavior: a neuropsychological approach.* Wiley, New York, USA; ISBN: 978-0805843002.

Hepler JR, Gilman AG (1992) G proteins. *Trends Biochem Sci.* 17: 383-7.

Hicks SP, D'Amato CJ (1968) Cell migrations to the isocortex in the rat. *Anat Rec.* 160: 619-34.

Hirst M, Haliday E, Nakamura J, Lou L (1994) Human GMP synthetase. Protein purification, cloning, and functional expression of cDNA. *J Biol Chem.* 269: 23830-7.

Hovakimyan M, Haas SJ, Schmitt O, Gerber B, Wree A, Andressen C (2006) Mesencephalic human neural progenitor cells transplanted into the neonatal hemiparkinsonian rat striatum differentiate into neurons and improve motor behaviour. *J Anat.* 209: 721-32.

Hye A, Lynham S, Thambisetty M, Causevic M, Campbell J, Byers HL, Hooper C, Rijdsdijk F, Tabrizi SJ, Banner S, Shaw CE, Foy C, Poppe M, Archer N, Hamilton G, Powell J, Brown RG, Sham P, Ward M, Lovestone S (2006) Proteome-based plasma biomarkers for Alzheimer's disease. *Brain.* 129: 3042-50.

Imada S, Yamamoto M, Tanaka K, Seiwa C, Watanabe K, Kamei Y, Kozuma S, Taketani Y, Asou H (2010) Hypothermia-induced increase of oligodendrocyte precursor cells: Possible involvement of plasmalemmal voltage-dependent anion channel 1. *J Neurosci Res.* 88: 3457-66.

Imamura F, Ayoub AE, Rakic P, Greer CA (2011) Timing of neurogenesis is a determinant of olfactory circuitry. *Nat Neurosci.* 14: 331-7.

International Genetic Standardization (IGS) Program.

(www.criver.com/files/pdfs/rms/rm_rm_r_igs.aspx).

Jacobson RD, Virág I, Skene JH (1986) A protein associated with axon growth, GAP-43, is widely distributed and developmentally regulated in rat CNS. *J Neurosci.* 6: 1843-55.

Janssens V, Goris J (2001) Protein phosphatase 2A: A highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem. J.* 353: 417-439.

Jin MH, Lee YH, Kim JM, Sun HN, Moon EY, Shong MH, Kim SU, Lee SH, Lee TH, Yu DY, Lee DS (2005) Characterization of neural cell types expressing peroxiredoxins in mouse brain. *Neurosci Lett.* 381: 252-7.

Kalil K, Skene JH (1986) Elevated synthesis of an axonally transported protein correlates with axon outgrowth in normal and injured pyramidal tracts. *J Neurosci.* 6: 2563-70.

Kaplan MS, Hinds JW (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science.* 197: 1092-4.

Karas M, Hillenkamp F (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* 60: 2299-301.

Keilani S, Sugaya K (2008) Reelin induces a radial glial phenotype in human neural progenitor cells by activation of Notch-1. *BMC Developmental Biology.* 8: 69.

Kinoshita A, Noda M, Kinoshita M (2000) Differential localization of septins in the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 428: 223-39.

Kishi K (1987) Golgi studies on the development of granule cells of the rat olfactory bulb with reference to migration in the subependymal layer. *J Comp Neurol.* 258: 112-24.

Kishimoto Y, Davies WE, Radin NS (1965) Developing rat brain: changes in cholesterol, galactolipids, and the individual fatty acids of gangliosides and glycerophosphatides. *J Lipid Res.* 6: 532-6.

Klose J, Kobalz U (1995) Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis.* 16: 1034-59.

Kong KY, Kedes L (2006) Leucine 135 of tropomodulin-1 regulates its association with tropomyosin, its cellular localization, and the integrity of sarcomeres. *J. Biol. Chem.* 281: 9589-99.

Kong J, Xu Z (1998) Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1. *J Neurosci.* 18: 3241-50.

Konus M, Koy C, Mikkat S, Kreutzer M, Zimmermann R, Iscan M, Glocker MO (2013) Molecular adaptations of *Helicoverpa armigera* midgut tissue under pyrethroid insecticide stress characterized by differential proteome analysis and enzyme activity assays. *Genom. Proteom.* 8: 152-62.

Kostovic I, Rakic P (1990) Developmental history of the transient subplate zone in the visual and somatosensory cortex of the macaque monkey and human brain. *J Comp Neurol.* 297: 441-70.

Kostyukova AS, Rapp BA, Choy A, Greenfield NJ, Hitchcock-De Gregori SE (2005) Structural requirements of tropomodulin for tropomyosin binding and actin filament capping. *Biochemistry.* 44: 4905-10.

Krapfenbauer K, Engidawork E, Cairns N, Fountoulakis M, Lubec G. Aberrant expression of peroxiredoxin subtypes in neurodegenerative disorders (2003) *Brain Res.* 967: 152-60.

Land JM, Booth RF, Berger R, Clark JB (1977) Development of mitochondrial energy metabolism in rat brain. *Biochem J.* 164: 339-48.

Lessner G, Schmitt O, Haas SJ, Mikkat S, Kreutzer M, Wree A, Glocker MO (2010) Differential proteome of the striatum from hemiparkinsonian rats displays vivid structural remodeling processes. *J Proteome Res.* 9: 4671-87.

Leong SF, Clark JB (1984) Regional enzyme development in rat brain. Enzymes of energy metabolism. *Biochem J.* 218: 139-45.

Li H, Chen G, Zhou B, Duan S (2008) Actin filament assembly by myristoylated alanine-rich C kinase substrate-phosphatidylinositol-4,5-diphosphate signaling is critical for dendrite branching. *Mol Biol Cell.* 19: 4804-13.

Li X, Serwanski DR, Miralles CP, Nagata K, De Blas AL (2009) Septin 11 is present in GABAergic synapses and plays a functional role in the cytoarchitecture of neurons and GABAergic synaptic connectivity. *J. Biol. Chem.* 284: 17253-65.

- Liem RK, Messing A (2009) Dysfunctions of neuronal and glial intermediate filaments in disease. *J Clin Invest.* 119: 1814-24.
- Liu SH, Cheng HH, Huang SY, Yiu PC, Chang YC (2006) Studying the protein organization of the postsynaptic density by a novel solid phase- and chemical cross-linking-based technology. *Mol Cell Proteomics.* 5: 1019-32.
- Lockwood A, Bailey E (1971) The course of ketosis and the activity of key enzymes of ketogenesis and ketone-body utilization during development of the postnatal rat. *Biochem J.* 124: 249-254.
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1993) Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 2074-7.
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1995) Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates. *Stem Cells.* 13: 263-72.
- Lorenz P, Bantscheff M, Ibrahim SM, Thiesen HJ, Glocker MO (2003) Proteome analysis of diseased joints from mice suffering from collagen-induced arthritis. *Clin Chem Lab Med.* 41: 1622-32.
- Lu T, Pan Y, Kao SY, Li C, Kohane I, Chan J, et al. (2004) Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature.* 429: 883-91.
- Luskin MB (1993) Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron.* 11: 173-89.
- Luskin MB, Boone MS (1994) Rate and pattern of migration of lineally-related olfactory bulb interneurons generated postnatally in the subventricular zone of the rat. *Chem Senses.* 19: 695-714.
- Maletta GJ, Timiras PS (1968) Choline acetyltransferase activity and total protein content in selected optic areas of the rat after complete light-deprivation during CNS development. *J Neurochem.* 15: 787-93.
- Mason CA, Gregory E (1984) Postnatal maturation of cerebellar mossy and climbing fibers: transient expression of dual features on single axons. *J Neurosci.* 4: 1715-35.

- Maurya DK, Sundaram CS, Bhargava P (2009) Proteome profile of the mature rat olfactory bulb. *Proteomics*. 9: 2593-99.
- McConnell SK, Ghosh A, Shatz CJ (1989) Subplate neurons pioneer the first axon pathway from the cerebral cortex. *Science*. 245: 978-82.
- McNeil AK, Rescher U, Gerke V, McNeil PL (2006) Requirement for annexin A1 in plasma membrane repair. *J. Biol. Chem.* 46: 35202-7.
- Medina PM, Worthen RJ, Forsberg LJ, Brenman JE (2008) The actin-binding protein capulet genetically interacts with the microtubule motor kinesin to maintain neuronal dendrite homeostasis. *PLoS One*. 3: e3054.
- Meyer G, Schaaps JP, Moreau L, Goffinet AM (2000) Embryonic and early fetal development of the human neocortex. *J Neurosci*. 20: 1858-68.
- Migheli A, Piva R, Casolino S, Atzori C, Dlouhy SR, Ghetti B (1999) A cell cycle alteration precedes apoptosis of granule cell precursors in the weaver mouse cerebellum. *Am J Pathol*. 155: 365-73.
- Moriizumi T, Sakashita H, Furukawa M, Kawano J, Okoyama S, Kitao Y, Kudo M (1995) Electron microscopic study of synaptogenesis and myelination of the olfactory centers in developing rats. *Exp Brain Res*. 103: 385-92.
- Mombaerts P, Wang F, Dulac C, Chao SK, Nemes A, Mendelsohn M, Edmondson J, Axel R (1995) Visualizing an olfactory sensory map. *Cell*. 87: 675-86.
- Mostowy S, Cossart P (2012) Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 13: 183-94.
- Moya KL, Benowitz LI, Jhaveri S, Schneider GE (1987) Enhanced visualization of axonally transported proteins in the immature CNS by suppression of systemic labeling. *Brain Res*. 428: 183-91.
- Neuhoff V, Philipp K, Zimmer HG, Mesecke S (1979) A simple, versatile, sensitive and volume-independent method for quantitative protein determination which is independent of other external influences. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*. 360: 1657-70.

Nissim I (1999) Newer aspects of glutamine/glutamate metabolism: the role of acute pH changes. *Am J Physiol.* 277: 493-7.

Noel J, Ralph GS, Pickard L, Williams J, Molnar E, Uney JB, Collingridge GL, Henley JM (1999) Surface expression of AMPA receptors in hippocampal neurons is regulated by an NSF-dependent mechanism. *Neuron.* 23: 365-76.

Paxinos G (2004) *The Rat Nervous System. 3rd ed. Academic Press; London, UK; ISBN: 978-0123742452.*

Ohkawa N, Hashimoto K, Hino T, Migishima R, Yokoyama M, Kano M, Inokuchi K (2007) Motor discoordination of transgenic mice overexpressing a microtubule destabilizer, stathmin, specifically in Purkinje cells. *Neurosci Res.* 59: 93-100.

Okano J, Pfaff W. (1993) RB and Cdc2 expression in brain: correlations incorporation and neurogenesis with 3H-thymidine. *J Neurosci.* 13: 2930-8.

Ong SE, Mann M (2005) Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat Chem Biol.* 1: 252-62.

Pass D, Freeth G (1993) The Rat. *Anzcart News.* 6: 1-4.

Pearl PL, Parviz M, Vogel K, Schreiber J, Theodore WH, Gibson KM (2014) Inherited disorders of gamma-aminobutyric acid metabolism and advances in ALDH5A1 mutation identification. *Dev Med Child Neurol.* doi: 10.1111/dmcn.12668.

Pernier J, Shekhar S, Jegou A, Guichard B, Carlier MF (2016) Profilin Interaction with Actin Filament Barbed End Controls Dynamic Instability, Capping, Branching, and Motility. *Dev Cell.* 36: 201-14.

Perrone-Bizzozero NI, Finklestein SP, Benowitz LI (1986) Synthesis of a growth-associated protein by embryonic rat cerebrocortical neurons in vitro. *J Neurosci.* 6: 3721-30.

Perry GW, Burmeister DW, Grafstein B (1987) Fast axonally transported proteins in regenerating goldfish optic axons. *J Neurosci.* 7: 792-806.

Phinney BS, Thelen JJ (2005) Proteomic characterization of a triton-insoluble fraction from chloroplasts defines a novel group of proteins associated with macromolecular structures. *J Proteome Res.* 4: 497-506.

Power JH, Asad S, Chataway TK, Chegini F, Manavis J, Temlett JA, Jensen PH, Blumbergs PC, Gai WP (2008) Peroxiredoxin 6 in human brain: molecular forms, cellular distribution and association with Alzheimer's disease pathology. *Acta Neuropathol.* 115: 611-22.

Price NE, Wadzinski B, Mumby MC (1999) An anchoring factor targets protein phosphatase 2A to brain microtubules. *Mol. Brain Res.* 73: 68-77.

Proctor CJ, Lorimer IA (2011) Modelling the role of the Hsp70/Hsp90 system in the maintenance of protein homeostasis. *PLoS One.* 6: e22038.

Raimondi L, Cannino G, D'Asaro M, Sala A, Savettieri G, Di Liegro I (2002) Regulation of RNA metabolism in the nervous system. *Recent Res. Dev. Neurochem.* 5: 39-48.

Rakic P (1972) Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol.* 145: 61-83.

Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science.* 255: 1707-10.

Riederer BM, Porchet R, Marugg RA (1996) Differential expression and modification of neurofilament triplet proteins during cat cerebellar development. *J. Comp. Neurol.* 364: 704-17.

Rosselli-Austin L, Altman J (1979) The postnatal development of the main olfactory bulb of the rat. *J Dev Physiol.* 1: 295-313.

Sakakibara A, Ando R, Sapir T, Tanaka T (2013) Microtubule dynamics in neuronal morphogenesis. *Open Biol.* 3: 130061.

Santoni V, Kieffer S, Desclaux D, Masson F, Rabilloud T (2000) Membrane proteomics: use of additive main effects with multiplicative interaction model to classify plasma membrane proteins according to their solubility and electrophoretic properties. *Electrophoresis.* 21: 3329-44.

Schneider LV, Hall MP (2005) Stable isotope methods for high-precision proteomics. *Drug Discov Today.* 10: 353-63.

Schousboe A (2015) A Tribute to Mary C. McKenna: Glutamate as Energy Substrate and Neurotransmitter-Functional Interaction Between Neurons and Astrocytes. *Neurochem Res.* (ahead of print).

Schwarz SS, Freed WJ (1987) Brain tissue transplantation in neonatal rats prevents a lesion-induced syndrome of adipsia, aphagia and akinesia. *Exp Brain Res.* 65: 449-54.

Selcher JC, Nekrasova T, Paylor R, Landreth GE, Sweatt JD (2001) Mice lacking the ERK1 isoform of MAP kinase are unimpaired in emotional learning. *Learn Mem.* 8: 11-19.

Shatz CJ, Ghosh A, McConnell SK, Allendoerfer KL, Friauf E, Antonini A (1990) Pioneer neurons and target selection in cerebral cortical development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 55: 469-80.

Shimada M (1966) Cytokinetics and histogenesis of early postnatal mouse brain as studied by 3H-thymidine autoradiography. *Arch Histol Jpn.* 26: 413-37.

Skeen LC, Hall WC (1977) Efferent projections of the main and the accessory olfactory bulb in the tree shrew (*Tupaia glis*). *J Comp Neurol.* 172: 1-35.

Skene JH, Willard M (1981) Axonally transported proteins associated with axon growth in rabbit central and peripheral nervous systems. *J Cell Biol.* 89: 96-103.

Simmer JP, Kelly RE, Rinker AG, Jr, Scully JL, Evans DR (1990) Mammalian carbamyl phosphate synthetase (CPS) DNA sequence and evolution of the CPS domain of the Syrian hamster multifunctional protein CAD. *J Biol Chem.* 265: 10395-402.

Smart I (1961) The subependymal layer of the mouse brain and its cell production as shown by radioautography after thymidine-H3 injection. *J Comp Neurol.* 116: 325-47.

Stayton MM, Rudolph FB, Fromm HJ (1983) Regulation, genetics, and properties of adenylosuccinate synthetase: a review. *Curr Top Cell Regul.* 22: 103-41.

Stenbeck G (1998) Soluble NSF-attachment proteins. *Int J Biochem Cell Biol.* 30: 573-7.

Strittmatter SM, Valenzuela D, Kennedy TE, Neer EJ, Fishman MC (1990) G0 is a major growth cone protein subject to regulation by GAP-43. *Nature*. 344: 836-41.

Su B, Wang X, Nunomura A, Moreira PI, Lee HG, Perry G, et al. (2008) Oxidative stress signaling in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 5: 525-32.

Supèr H, Del Río JA, Martínez A, Pérez-Sust P, Soriano E (2000) Disruption of neuronal migration and radial glia in the developing cerebral cortex following ablation of Cajal-Retzius cells. *Cereb Cortex*. 10: 602-13.

Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, Riedel D, Urlaub H, Schenck S, Brügger B, Ringler P, et al. (2006) Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*. 127: 831-46.

Takei N, Kondo J, Nagaike K, Ohsawa K, Kato K, Kohsaka S (1991) Neuronal survival factor from bovine brain is identical to neuron-specific enolase. *J Neurochem*. 57: 1178-84.

Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T (1988) Protein and polymer analyses of up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2: 151.

Terry, AV Jr (2008) Neurodegeneration. *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*. Springer; BerlinHeidelberg-New York: 822-827; ISBN: 978-3540389187.

Teuchert M, Fischer D, Schwalenstoecker B, Habisch HJ, Böckers TM, Ludolph AC (2006) A dynein mutation attenuates motor neuron degeneration in SOD1(G93A) mice. *Exp Neurol*. 198: 271-4.

The BrainTx Committee NIJC (2014) Cerebellar Development Transcriptome Database. [(accessed on 1 April 2015)]. Available online: <http://www.cdtdb.neuroinf.jp/CDT/Download.do>.

Thelen Jay J (2003) Introduction to Proteomics: a Brief Historical Perspective on Contemporary Approaches. Plant Proteomics, chapter 1; *Springer Science & Business Media*; ISBN: 978-3540726173.

Tischfield MA, Engle EC (2010) Distinct alpha- and beta-tubulin isotypes are required for the positioning, differentiation and survival of neurons: new support for the 'multi-tubulin' hypothesis. *Biosci Rep*. 30: 319-30.

Tollervey JR, Wang Z, Hortobágyi T, Witten JT, Zarnack K, Kayikci M, et al. (2011) Analysis of alternative splicing associated with aging and neurodegeneration in the human brain. *Genome Res.* 21: 1572-82.

Toyo-oka K, Wachi T, Hunt RF, Baraban SC, Taya S, Ramshaw H, Kaibuchi K, Schwarz QP, Lopez AF, Wynshaw-Boris A (2014) 14-3-3 ϵ and ζ regulate neurogenesis and differentiation of neuronal progenitor cells in the developing brain. *J Neurosci.* 2014 34: 12168-81.

Trojan S, Langmeier M, Maresová D, Mourek J, Pokorný J (2004) Plasticity of the brain in neuroontogenesis. *Prague Med Rep.* 105: 97-110.

Trojan S, Pokorný J (1999) Theoretical aspects of neuroplasticity. *Physiol Res.* 48: 87-97.

Turpeenoja L, Villa RF, Magri G, Giuffrida Stella AM (1988) Changes of mitochondrial membrane proteins in rat cerebellum during aging. *Neurochem Res.* 13: 859-65.

Tzivion G, Avruch J (2002) 14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem.* 277: 3061-64.

Ueta H, Nagasawa H, Oyabu-Manabe Y, Toida K, Ishimura K, Hori H (2004) Localization of enolase in synaptic plasma membrane as an alpha-gamma heterodimer in rat brain. *Neurosci Res.* 48: 379-86.

Vannucci RC, Christensen MA, Stein DT (1989) Regional cerebral glucose utilization in the immature rat: Effect of hypoxia-ischemia. *Pediatr. Res.* 26: 208-14.

Vannucci RC, Vannucci SJ (2000) Glucose metabolism in the developing brain. *Semin. Perinatol.* 24: 107-15.

Vassar R, Chao SK, Sitcheran R, Nuñez JM, Vosshall LB, Axel R (1994) Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell.* 79: 981-91.

Villa RF, Gorini A, Ferrari F, Hoyer S (2013) Energy metabolism of cerebral mitochondria during aging, ischemia and post-ischemic recovery assessed by functional proteomics of enzymes. *Neurochem Int.* 63: 765-81.

- Wegele H, Muller L, Buchner J (2004) Hsp70 and Hsp90 - a relay team for protein folding. *Rev Physiol. Biochem. Pharmacol.* 151: 1-44.
- Westermeier R (2006) Sensitive, quantitative, and fast modifications for Coomassie Blue staining of polyacrylamide gels. *Proteomics.* 6: 61-4.
- Wiggins LM (2014) Morphological changes and altered expression of antioxidant proteins in a heterozygous dynein mutant; a mouse model of spinal muscular atrophy. *Oxid Antioxid Med Sci.* 3: 161-173.
- Wilbur DO, Patel MS (1974) Development of mitochondrial pyruvate metabolism in rat brain. *J Neurochem.* 22: 709-15.
- Wille M, Schümann A, Kreutzer M, Glocker MO, Wree A, Mutzbauer G, Schmitt O (2015) The proteome profiles of the olfactory bulb of juvenile, adult and aged rats - an ontogenetic study. *Proteome Sci.* 13: 8. (a)
- Wille M, Schümann A, Kreutzer M, Glocker MO, Wree A, Mutzbauer G, Schmitt O (2015) The proteome profiles of the cerebellum of juvenile, adult and aged rats - an ontogenetic study. *Int J Mol Sci.* 16: 21454-85. (b)
- Wilkinson KD, Urban MK, Haas AL (1980) Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *J Biol Chem.* 255: 7529-32.
- Whittaker VP, Michaelson IA, Kirkland RJ (1964) The separation of synaptic vesicles from nerve-ending particles ('synaptosomes'). *Biochem J.* 90: 293-303.
- Xue J, Tsang CW, Gai WP, Malladi CS, Trimble WS, Rostas JA, Robinson PJ (2004) Septin 3 (G-septin) is a developmentally regulated phosphoprotein enriched in presynaptic nerve terminals. *J. Neurochem.* 91: 579-90.
- Yuan A, Rao MV, Sasaki T, Chen Y, Kumar A, Veeranna, Liem RK, Eyer J, Peterson AC, Julien JP, Nixon RA (2006) Alpha-internexin is structurally and functionally associated with the neurofilament triplet proteins in the mature CNS. *J Neurosci.* 26: 10006-19.
- Yan LJ, Thangthaeng N, Forster MJ (2008) Changes in dihydrolipoamide dehydrogenase expression and activity during postnatal development and aging in the rat brain. *Mech Ageing Dev.* 129: 282-90.

Yi JJ, Ehlers MD (2007) Emerging roles for ubiquitin and protein degradation in neuronal function. *Pharmacol Rev.* 59: 14-39.

Yoshimura T, Kawano Y, Arimura N, Kawabata S, Kikuchi A, Kaibuchi K (2005) GSK-3 beta regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell.* 120: 137-49.

Zhang G, Assadi AH, Roceri M, Clark GD, D'Arcangelo G (2009) Differential interaction of the Pafah1b alpha subunits with the Reelin transducer Dab1. *Brain Res.* 1267: 1-8.

Zhou Y, Schopperle WM, Murrey H, Jaramillo A, Dagan D, Griffith LC, Levitan IB (1999) A dynamically regulated 14-3-3, Slob, and Slowpoke potassium channel complex in *Drosophila* presynaptic nerve terminals. *Neuron.* 22: 809-18.

7.2 Lösungen7.2.1 Gewebepräparation

Bezeichnung/Name	Zusammensetzung	Menge
Anästhesie	Ether	20-30 Tropfen (abhängig vom Körpergewicht)
Tötung	Na ⁺ -Lösung	60 mg/kg Körpergewicht
Perfusionslösung	0.9% NaCl-Lösung	100-400 ml (abhängig vom Körpergewicht)

7.2.2 Homogenisierung

Bezeichnung/Name	Zusammensetzung	Menge
Lysepuffer	Thioharnstoff 2M Harnstoff 7M CHAPS 4% DTT 7mM Bio-Lyte Ampholytes 3-10 (40%); 0,5%Reinstwasser (0,5 µS) zum Auffüllen	15,22 g 42,04 g 4 g 1,08 g 250 µl Gesamtvolumen: 100 ml
Complete-Lösung	„Complete mini“ Reinstwasser (0,5 µS)	1 Tablette 1,5 ml
Pepstatin A	Pepstatin A Ethanol	0,960 mg 10 ml
PMSF	PMSF Ethanol	174,2 g 10 ml

7.2.3 Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

Bezeichnung/Name	Zusammensetzung	Menge
Rehydrationspuffer	Thioharnstoff 2M Harnstoff 6M CHAPS 2% DTT 16mM Bio-Lyte Ampholytes 3-10 (40%); 1% Reinstwasser (0,5 µS) zum Auffüllen	1,903 g 9,009 g 0,3 g 62,5 mg 125 µl Gesamtvolumen: 25 ml
TRIS	Tris 1,5M Reinstwasser (0,5 µS) HCl 37% rauchend zum Einstellen des pH	18,17 g Gesamtvolumen: 100 ml bis pH 8,8
Äquilibrierungs Puffer (Stammlösung)	Tris-HCl ph 8,8 (1,5M) Harnstoff 6M Glycerol 30% SDS ultra pur 2% Reinstwasser (0,5 µS) Bromphenolblau	6,67 ml 72,07 g 69 ml 4,0 g 200 ml Spitze
Äquilibrierungs Puffer 1	Stammlösung DTT 64,8mM	5 ml 50 mg
Äquilibrierungs Puffer 2	Stammlösung IAA 216mM	5 ml 200 mg

7.2.4 SDS PAGE (2. Dimension)

Bezeichnung/Name	Zusammensetzung	Menge
Trenngelpuffer	Tris SDS Reinstwasser (0,5 µS) zum Auffüllen HCl 37% rauchend zum Einstellen des pH	181,65 g 4 g Gesamtvolumen: 1 l bis pH 8,8
12% Polyacrylamidgel/ 12 Gele pro Kammer	Trenngelpuffer Reinstwasser Acrylamid 40% 29:1 Temed Ammoniumperoxisulfat: Reinstwasser (1:10) Butanol: Reinstwasser (0,5 µS) zum Überschichten	280,8 ml 210,6 ml 211,8 ml 250 µl 3,5 ml ca. 10 ml
Elektrodenpuffer	Tris Glycin SDS Reinstwasser (0,5 µS) zum Auffüllen	30,3 g 144 g 10 g Gesamtvolumen: 11 l
Agarose	Agarose Trenngelpuffer pH 8,8 SDS Glycerol Reinstwasser (0,5 µS) zum Auffüllen	1 g 3,4 l 1,6 g 30 ml Gesamtvolumen: 100 ml

7.2.5 Fixierung und Färbung

Bezeichnung/Name	Zusammensetzung	Menge
Fixiererlösung	Methanol 45% Eisessig 1% Reinstwasser 54%	450 ml 10 ml 540 ml
Coomassie- Färbelösung	Ammoniumsulfat Ortho Phosphorsäure Collidales Coomassie Brilliant Blue G250 Reinstwasser (0,5 µS) zum Auffüllen Methanol 4:1 Verdünnung	100 g 11,7 ml 1 g Gesamtvolumen: 1 l 250 ml
Lagerungslösung	Natriumazid (NaN ₃) Reinstwasser (0,5 µS)	200 ml 1 l

7.2.6 Massenspektrometrische Analyse

Bezeichnung/Name	Zusammensetzung	Menge
Trypsin-Lösung	3mM (10 ng/μl)	1 Vial 2 ml TRIS/HCl (pH 8,5)
Waschlösung 1	30% Acetonitril in 25mM NH ₄ HCO ₃	15 ml Acetonitril 12,5 ml 100mM NH ₄ HCO ₃ 22,5 ml Reinstwasser
Waschlösung 2	50% Acetonitril in 10mM NH ₄ HCO ₃	25 ml Acetonitril 5 ml 100mM NH ₄ HCO ₃ 20 ml Reinstwasser
Extraktions-Lösung	0,3% Trifluoressigsäure 50% Acetonitril	180 μl 1% Trifluoressigsäure 300 μl Acetonitril 120 ml Reinstwasser
Matrix-Lösung	9 mg/ml α-Cyano-4-Hydroxymzimtsäure in 50% ACN, 0,1% Trifluoressigsäure	-

7.2.7 Western Blot Analyse

Bezeichnung/Name	Zusammensetzung	Menge
TBS	Tris NaCl	1,2 g 8,76 g Gesamtmenge: 1 l, pH: 7,3
Transferpuffer	Tris Glycin Methanol	3 g 14,4 g 200 ml
Ponceau S	Ponceau S TCA	1% 3% Gesamtmenge: 1 l
TBST	Tween 20 TBS	1 ml 1 l Gesamtmenge: 1 l

7.3 Verwendete Antikörper für die Western Blot Analyse

Bezeichnung/Name	Konzentration/Verdünnung	Hersteller
<i>Primärantikörper</i>		
rabbit polyclonal anti-Gamma-enolase	1:500	Sigma-Aldrich-Corporation, St. Louis, MO, USA
mouse monoclonal anti - α Tubulin	1:1000	Sigma-Aldrich-Corporation, St. Louis, MO, USA
goat monoclonal anti-neurofilament medium	1:2000	Sigma-Aldrich-Corporation, St. Louis, MO, USA
mouse monoclonal anti-neurofilament low	1:500	Sigma-Aldrich-Corporation, St. Louis, MO, USA
rabbit polyclonal anti-Erk 1,2	1:500	ZYTOMED Systems GmbH, Berlin, Germany
mouse monoclonal anti-Erk 1,2 P	1:500	Sigma-Aldrich-Corporation, St. Louis, MO, USA
<i>Sekundärantikörper(HRP-conjugated)</i>		
anti-mouse	1:2000	Sigma-Aldrich-Corporation, St. Louis, MO, USA
anti-goat	1:2000	Sigma-Aldrich-Corporation, St. Louis, MO, USA
anti-rabbit	1:2000	Sigma-Aldrich-Corporation, St. Louis, MO, USA

7.4 Chemikalien

α -cyano-4-Hydroxycimtsäure (Bruker Daltonics, Bremen, Germany)

Acetonitril (J.T. Baker, Deventer, Netherlands)

Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (40% 29:1) (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany)

Agarose (Carl-Roth GmbH und CoKG., Karlsruhe, Germany)

Ammoniumhydrogencarbonat (Fluka, Buchs, Switzerland)

Ammoniumperoxidsulfat (Carl-Roth GmbH und CoKG., Karlsruhe, Germany)

Ampholyte high resolution (pH 3-10) (BioChemika, Sigma-Aldrich-Corporation, St. Louis, MO, USA)

Bradford-Reagenz (Sigma-Aldrich-Corporation, St. Louis, MO, USA)

Bromphenolblau-Natriumsalz (Carl-Roth GmbH und CoKG., Karlsruhe, Germany)

BSA-Rinderserumalbumin (Sigma-Aldrich-Corporation, St. Louis, MO, USA)

Chaps (>98% (TLC)) (Sigma-Aldrich-Corporation, St. Louis, MO, USA)

Collodiales Coomassie Brilliant Blau G250 (Carl-Roth GmbH und CoKG., Karlsruhe, Germany)

Complete Mini (Roche Diagnostics GmbH, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland)

DL-Dithiothreitol (>98% (TLC)>99%(Titration)) (Sigma-Aldrich-Corporation, St. Louis, MO, USA)

ECL-Kit, ECL-Prime (Amersham plc, Amersham, UK)

Eisessig (J.T. Baker, Mallinkrod Baker, Inc, Phillipsburg, NJ, USA)

Entwickler, Kodak D-19 (Kodak GmbH, Stuttgart, Germany)

Ethanol (96%) (Universitätsmedizin-Rostock-Apotheke)

Ether (Universitätsmedizin-Rostock-Apotheke)

Fixierer, Agfa Rapid Fixierer (Agfa, Mortsel, Belgium)

Glycerol (Sigma-Aldrich-Corporation, St. Louis, MO, USA)

Glycin Pufferan (>99%, p.a.) (Carl-Roth GmbH und CoKG., Karlsruhe, Germany)

Harnstoff (Carl-Roth GmbH und CoKG., Karlsruhe, Germany)

HCl Salzsäure, rauchend (37%) (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany)

Methanol (Lab-Scan, Dublin, Ireland)

Milchpulver (Carl-Roth GmbH und CoKG., Karlsruhe, Germany)

Mineralöl (Biorad, Hercules, CA, USA)

NaCl (J.T. Baker, Deventer, Netherlands)

Natriumazid (Aldrich-Chemie, Steinheim, Germany)

NNN'N'-Tetramethylethylendiamine for electrophoresis (99%) (Biorad, Hercules, CA, USA)

Ortho Phosphorsäure (85%) (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany)

Pentobarbital (Sigma-Aldrich-Corporation, St. Louis, MO, USA)

Pepstatin A (Sigma-Aldrich-Corporation, St. Louis, MO, USA)

PMSF (Fluka, Buchs, Switzerland)

Ponceau S solution (Sigma-Aldrich-Corporation, St. Louis, MO, USA)

Reinstwasser (0,5 µS) (Reinstwasseranlage, Institut f. Anatomie, Rostock, Germany)

SDS Pellets ultra pur (>99%) (Carl-Roth GmbH und CoKG., Karlsruhe, Germany)

Stickstoff (flüssig) (AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, 40235 Düsseldorf, Germany)

Thioharnstoff (Sigma-Aldrich-Corporation, St. Louis, MO, USA)

Trichloressigsäure (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany)

Trifluoressigsäure (Pierce Protein Research Product, Rockford, IL, USA)

Tris (Carl-Roth GmbH und CoKG., Karlsruhe, Germany)

Trypsin (Promega, Mannheim, Germany)

Tween 20 (Sigma-Aldrich-Corporation, St. Louis, MO, USA)

7.5 Geräte/Materialien7.5.1 Homogenisierung

Pipetten	0,5-10 µl 10-100 µl 100-1000 µl	Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Pipettenspitzen	200 µl 1000 µl	Eppendorf epT.I.P.S	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Eppendorfgefäße	0,5 ml 1,5 ml 2 ml	Eppendorf Safe-Lock	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Potter und Stößel	-		Amersham plc, Amersham, UK
Glaskugeln	-		Carl-Roth GmbH und CoKG., Karlsruhe, Germany
Rührfische	-		Carl-Roth GmbH und CoKG., Karlsruhe, Germany
Bechergläser	-		Witeg Labortechnik GmbH, Wertheim, Germany
Crushed Ice	RNS-0244A 19 3/4"		Manitowoc, WI, USA
Reinstwasseranlage	Ultra Clear		Evoqua Water Technologies LLC, PA, USA

pH-Meter	Schott Instruments Lab 850	SCHOTT Instruments GmbH, Mainz, Germany
Vortexer	Heidolph Reax Control	Heidolph Instruments Labortechnik, Schwabach, Germany
Magnetrührer	Heidolph MR-Hei-Standard	Heidolph Instruments Labortechnik, Schwabach, Germany
Zentrifuge	Beckman J2-HS	Beckman Coulter, Brea, Ca, USA
Ultraschallgerät	Bandelin Sonorex	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Germany
Photometer	Ultraspec 1100 Pro	Amersham plc, Amersham, UK
Küvetten	Micro	Carl-Roth GmbH und CoKG., Karlsruhe, Germany

7.5.2 Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

IPG Strips	Immobeline Dry Strip ph 3-10 NL, 18 cm	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
IEF System	Protean Plus IEF Cell System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Ca, USA
IEF Kammer		
Reagenzglasschüttler	Reax Control	Heidolph Instruments Labortechnik, Schwabach, Germany
Feinwaage	Kern ABT 320-4M	KERN & SOHN GmbH, Balingen, Germany

7.5.3 SDS PAGE (2. Dimension)

Gelkammer	PROTEAN Plus Dodeca Cell Protean Plus Multicasting	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Ca, USA
Kühlgerät	Julabo F10	Julabo Labortechnik, Seelbach, Germany
Generator	PowerPac 1000	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Ca, USA
Mikrowelle	HMT75M421	Robert Bosch GmbH, Gerlingen, Germany

7.5.4 Digitalisierung

Gel-Trockner	GelAir Drying System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Ca, USA
Scanner	F4100 Nexscan Scanner	Specsen, Heidelberg, Germany
Gel Spotting Software	Progenesis PG200 Version 2006	Nonlinear Dynamics Ltd., Newcastle upon Tyne, UK
Analysis Software	Access Excel	Windows, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA

7.5.5 Massenspektrometrische Analyse

Spotpicker	Flexys Proteomics picker	Genomic Solutions, Ann Arbor, MI, USA
Maldi Target Chip	384/600 µm AnchorChip	Bruker Corporation, Billerica, MA, USA
96er Wellplatten	-	Genomic Solutions, Ann Arbor, MI, USA
Massen Spektrometer	4700 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF mass spec	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Software	4700 Explore™ software	Applied Biosystems, Warrington, Cheshire, UK
Proteinidentifikation	MASCOT, Version 2.4.0	Matrix Science, London, UK

7.5.6 Western Blot Analyse

Proteinbestimmung nach Neuhoff	<i>Cellulose Acetate Membrane</i> <i>Amidoschwarz 10B Farbstoff</i>	Sartorius, Göttingen, Germany Merck, KGaA, Darmstadt, Germany
Gel-WB-Kammer	Mini Protean Tetrasystem	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Ca, USA
PVDF-Membran	Hybond-P	Amersham plc, Amersham, UK
Molekulargewichts Marker	All Blue Standard	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Ca, USA
WB Filter Membran	Trans Blot Filter Paper	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Ca, USA
Gele	Mini Protean TGX Gels 4-7,5%, 10 Wells	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Ca, USA
Laufpuffer	10 x TGS Buffer	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Ca, USA
Spritzen (Probenauftrag)	Hamilton Spritze 10, 25 µl	Hamilton Messtechnik GmbH, Höchst im Odenwald, Germany
Fotopapier	Cl-Xposure X-Ray Film	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

7.6 Ergebnistabellen aller gepickten Spots/Proteine

Tabelle A1 (a-d): Ergebnistabellen der identifizierten Proteine durch Peptide Mass Fingerprinting der Coomassie gefärbten Gele ((a) oB, (b) Ce, (c) Co). Die Einordnung entspricht der jeweiligen funktionellen Klasse des Proteins. Spot ID: Spot Nummer innerhalb des Gels, an dessen Position das jeweilige Protein gefunden wurde; Accession: Accession Nummer (von UniProtKB/Swiss-Prot); Entry name: Entry name-Bezeichnung (UniProtKB/Swiss-Prot); Gene name: Gene name-Bezeichnung (UniProtKB/Swiss-Prot); analysierte Proteine, welche eine differentielle Expression innerhalb beider Entwicklungszeitpunkte zeigten, sind nebeneinander aufgeführt (Regulation [P7]/Regulation [P637]); zell. Lokalisation: Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle (siehe Abkürzungsverzeichnis); H: Anzahl an differentiell exprimierten Spots pro biologischem Replikat; Kontrolle/PD: Spot Volumen Quotient; Score: Mascot MOWSE-Score; MW: Theoretische molekulare Masse (in Da); pI: Theoretischer pI Wert (Mascot report); Qm: Anzahl an dem jeweiligen Protein zugeordneten tryptischen Peptiden; (+), entweder nicht eindeutig innerhalb einer Fraktion oder multiple Proteine innerhalb eines Spots vorhanden. **(d) Ergebnistabelle der identifizierten Proteine durch Peptide Mass Fingerprinting der Coomassie gefärbten Gele des Ce.** Hierbei sind zusätzlich die Ergebnisse der „multi condition coverage method“ wie auch die des „Mann-Whitney *U*“-Tests aufgeführt.

7.6.1 Ergebnistabelle des Bulbus olfactorius

7.6.1 Tab. A1 (a): Ergebnistabelle des oB.

SpotID	Accession	Entry name	Gene name	Funkt. Gruppe/Protein Name	Regulation [P7]	Regulation [P637]	zell. Lokalisation	H	Kontrolle/PD	Score	MW	pI	Qm (*)
Proteine Kohlenstoffmetabolismus					(SVQ ≤0.6)	(SVQ ≥1.67)	(P90/P7, P637)						
287	Q9ER34	ACON_RAT	Aco2	Aconitate hydratase, mitochondrial	down	-	Mito	5	1.9	214	86121	7.87	27
811	P51635	AK1A1_RAT	Akr1a1	Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]	up	-	Cts, M	6	0.6	193	36711	6.84	16 +
902	P11884	ALDH2_RAT	Aldh2	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	down	-	Mmt	5	2.3	209	56966	6.63	19
472	P04764	ENOA_RAT	Eno1	Alpha-enolase	up	-	Cp, M	4	0.3	183	47440	6.16	17
111	Q68FY0	QCR1_RAT	Uqcrc1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	down	-	Mim	6	2.4	157	53500	5.57	22
1166	P11240	COX5A_RAT	Cox5a	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	down	-	Mim	6	2.5	62	16347	6.08	4
776	P09117	ALDOC_RAT	Aldoc	Fructose-bisphosphate aldolase C	p7: abs	-	Cp, Mito, A	5	-	191	39658	6.67	16
121	P07323	ENOG_RAT	Eno2	Gamma-enolase	down	-	Cp, M	6	2.7	221	47510	5.03	27
910	P05370	G6PD_RAT	G6pdx	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	down	-	Cp, Cts	6	3.1	360	59794	5.97	45
328	D4A0W9	D4A0W9_RAT	Ganab	Glucosidase, alpha; neutral AB	up	-	ER, Golgi	6	0.5	225	10729	5.69	30
1336	P04797	G3P_RAT	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	down	-	Cp, Nc	6	1.8	232	36090	8.14	33

Anhang: Ergebnistabellen

750	D3ZAP9	D3ZAP9_RAT	Gpd1l	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like	p7: abs	-	Cp	5	-	74	38726	6.61	8	+
47	Q99NA5	IDH3A_RAT	Idh3a	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	p7: abs	-	Mito	4	-	144	40044	6.47	17	
44	P42123	LDHB_RAT	Ldhb	L-lactate dehydrogenase B chain	down	-	Cp	5	2.3	312	36874	5.7	34	+
659	O88989	MDHC_RAT	Mdh1	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	down	-	Cp	6	2.5	150	36631	6.16	17	
846	P19804	NDKB_RAT	Nme2	Nucleoside diphosphate kinase B	up	-	Cp, M	5	0.5	117	17386	6.92	9	
1271	P25113	PGAM1_RAT	Pgam1	Phosphoglycerate mutase 1	down	-	Nc, Cts	6	2.5	78	31895	8.39	13	+
32	P49432	ODPB_RAT	Pdhb	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	down	-	Mmt	5	2.0	127	39299	6.2	18	
795	P11980	KPYM_RAT	Pkm2	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	down	-	Cp, Nc	5	3.1	77	61719	8.05	17	+
710	F1LM47	F1LM47_RAT	Suc1a2	Succinyl-CoA synthetase beta-A chain	down	-	Mito, Mmt	6	2.8	208	50616	7.57	28	
493	Q9EQS0	TALDO_RAT	Taldo1	Transaldolase	up	-	Cp	6	0.5	110	40753	7.64	13	+
1283	P48500	TPIS_RAT	Tpi1	Triosephosphate isomerase	down	-	Nc, Cts	6	3.0	199	27345	6.89	19	+
657	P97532	THMT_RAT	Mpst	3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase	-	down	Cp, Mito	6	1.9	167	33205	5.88	11	
555	P26284	ODPA_RAT	Pdha1	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	-	up	Mmt	5	0.5	63	43883	8.49	11	+
1129/442	Q5XI78	ODO1_RAT	Ogdh	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	down	down	Mmt	5	3.3	237	11741	6.30	35	
662	P29266	3HIDH_RAT	Hibadh	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	p7: abs	-	Mito	6	-	91	35679	8.73	8	
Proteine Aminosäuremetabolismus														
783	D3ZW08	D3ZW08_RAT	Adsl	Adenylosuccinate lyase (Predicted)	down	-	Cp, Mito	4	2.2	119	55615	6.68	17	
761	P13221	AATC_RAT	Got1	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	down	-	Cp	6	2.1	253	46628	6.73	26	
815	P47727	CBR1_RAT	Cbr1	Carbonyl reductase [NADPH] 1	up	-	Cp	6	0.5	179	30844	8.22	15	
209	Q6Q0N1	CNDP2_RAT	Cndp2	Cytosolic non-specific dipeptidase	down	-	Cp	6	3.0	162	53116	5.43	18	
737	B2RYW9	FAHD2_RAT	Fahd2	Fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 2	down	-	Mito	6	6.7	107	32353	7.44	9	+
795,811	P10860	DHE3_RAT	Glud1	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	down	-	Mmt	5	3.1	77	61719	8.05	17	+
769	P09606	GLNA_RAT	Glul	Glutamine synthetase	down	-	Cp, Mito	6	2.5	259	42982	6.64	32	
343	Q4V7C6	GUAA_RAT	Gmps	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	up	-	Cp	6	0.3	111	77507	6.21	14	
1248	P62959	HINT1_RAT	Hint1	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	p7: abs	-	Cp	5	-	115	13882	6.36	8	
750	Q5RJQ4	SIR2_RAT	Sirt2	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2	p7: abs	-	Cp, Csk	4	-	76	39921	6.67	8	+

Anhang: Ergebnistabellen

697	O35331	PDXK_RAT	Pdxk	Pyridoxal kinase	down	-	Cp	6	3.1	177	35114	6.32	18	
Proteine Fettmetabolismus														
1271	P14604	ECHM_RAT	Echs1	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	down	-	Mmt	6	2.5	78	31895	8.39	13	+
668	P15650	ACADL_RAT	Acadl	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	down	-	Mmt	5	2.0	170	48242	7.63	13	
283	Q924N5	ACBG1_RAT	Acsbg1	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase ACSBG1	down	-	Cp, Cpv	4	2.2	147	81266	5.65	13	
1187	D3ZVR7	PGFS_RAT	Fam213b	Prostamide/prostaglandin F synthase	p7: abs	-	Cp, Cts	5	-	120	21992	5.75	8	
Proteine Energiemetabolismus														
1257	P39069	KAD1_RAT	Ak1	Adenylate kinase isoenzyme 1	down	-	Cp	6	2.6	167	21684	7.66	19	
807/811	P15999	ATPA_RAT	Atp5a1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	down	down	Mim, M	6	10.5	289	59831	9.22	32	+
1258/945	P31399	ATP5H_RAT	Atp5h	ATP synthase subunit d, mitochondrial	down	up	Mito, Mim	6	6.1	157	18809	6.17	15	
68,70,75/44	P07335	KCRB_RAT	Ckb	Creatine kinase B-type	down	up	Cp	5	2.3	196	42983	5.39	16	+
1283	P20788	UCRL_RAT	Uqcrcs1	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	down	-	Mim	6	3.0	88	29712	9.04	11	
493	Q561S0	NDUAA_RAT	Ndufa10	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	up	-	Mmt	6	0.5	110	40753	7.64	13	
712	Q641Y2	NDUS2_RAT	Ndufs2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	down	-	Mim	6	2.1	259	52927	6.52	26	
315	Q66HF1	NDUS1_RAT	Ndufs1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	down	-	Mim	6	1.9	412	80331	5.65	44	
844	P12075	COX5B_RAT	Cox5b	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	-	up	Mim	6	0.3	81	14191	7.68	8	
684	Q07116	SUOX_RAT	Suox	Sulfite oxidase, mitochondrial	-	p90: abs	MimS	5	-	125	61167	6.41	14	
Proteine Degradation														
548	Q63570	PRS6B_RAT	Psmc4	26S protease regulatory subunit 6B	up	-	Cp, Nc	6	0.4	120	47493	5.09	16	
171	G3V8T4	G3V8T4_RAT	Ddb1	DNA damage-binding protein 1	up	-	Nc	5	0.5	319	12811	5.14	40	
779	P60901	PSA6_RAT	Psma6	Proteasome subunit alpha type-6	up	-	Cp, Nc	6	0.3	201	27838	6.34	14	
777	Q9JHW0	PSB7_RAT	Psmb7	Proteasome subunit beta type-7	up	-	Cp, Nc	6	0.3	116	30250	8.13	10	
749	Q00981	UCHL1_RAT	Uchl1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	up	-	Cp, ER	6	0.5	160	25165	5.14	14	
468	Q63347	PRS7_RAT	Psmc2	26S protease regulatory subunit 7	-	p90: abs	Cp, Nc	5	-	320	48943	5.59	33	

Anhang: Ergebnistabellen

993	D4AEH3	D4AEH3_RAT	Psmc7	Proteasome (Prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 7 (Predicted)	-	up	P, Np	4	0.6	74	36526	6.33	7
Proteine Antioxidantia													
670	O08557	DDAH1_RAT	Ddah1	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	up	-	Mito, Cp	6	0.6	248	31805	5.75	18
770	Q6MG60	DDAH2_RAT	Ddah2	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	up	-	Cp	5	0.5	212	30012	5.66	14
1026	Q9Z0V5	PRDX4_RAT	Prdx4	Peroxiredoxin-4	p90: abs	-	Cp, Sc	4	-	103	31216	6.18	7
1186	O35244	PRDX6_RAT	Prdx6	Peroxiredoxin-6	down	-	Cp, Lyso	6	2.3	236	24860	5.64	14
1173/940	P07632	SODC_RAT	Sod1	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	down	up	Cp	6	8.2	105	16073	5.88	6 +
1263	Q9Z1B2	GSTM5_RAT	Gstm5	Glutathione S-transferase Mu 5	-	down	Cp	6	1.8	211	27067	6.33	23
Proteine Transmittermetabolismus													
842	P51650	SSDH_RAT	Aldh5a1	Succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial		down	Mito	6	1.7	172	56723	8.35	20
Proteine Biosynthese													
526	P38983	RSSA_RAT	Rpsa	40S ribosomal protein SA	up	-	M, Cp, Nc	5	0.1	157	32918	4.8	12
395	P60123	RUVB1_RAT	Ruvb1	49 kDa TATA box-binding protein-interacting protein	up	-	Nc	6	0.6	151	50524	6.02	16
457	Q68FR6	EF1G_RAT	Eef1g	Elongation factor 1-gamma	up	-	Rs, Cts	6	0.3	222	50371	6.31	25
665	P85834	EFTU_RAT	Tufm	Elongation factor Tu, mitochondrial	down	-	Mito	6	2.0	265	49890	7.23	23
678	Q6P3V8	Q6P3V8_RAT	Eif4a1	Eukaryotic translation initiation factor 4A1	up	-	Cts	6	0.4	199	46353	5.32	34
626	Q4V8K6	Q4V8K6_RAT	Hnrnpc	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (C1/C2)	up	-	Sc	6	0.5	68	32894	4.86	7
827/70	Q794E4	HNRPF_RAT	Hnrnpf	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	up	up	Nc, Np	4	0.3	121	46043	5.31	21 +
907	Q6AY09	HNRH2_RAT	Hnrnp2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	down	-	Nc, Np	6	3.2	108	49547	5.89	17 +
319,938/161	P61980	HNRPK_RAT	Hnrmpk	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	up	up	Cp, Nc	5	0.3	125	51230	5.39	16
431	P43244	MATR3_RAT	Matr3	Matrin-3	down	-	Nm	6	2.0	218	94902	5.82	27
519	G3V6H9	G3V6H9_RAT	Nap111	Nucleosome assembly protein 1-like 1	up	-	Nc	6	0.3	88	45630	4.36	6
638	Q5U2Z3	NP1L4_RAT	Nap114	Nucleosome assembly protein 1-like 4	up	-	Nc	6	0.3	69	44118	4.58	7
1195	Q9JMJ4	PRP19_RAT	Prpf19	Pre-mRNA-processing factor 19	up	-	Nc, Cp	6	0.3	80	55661	6.14	10

Anhang: Ergebnistabellen

847	Q925G0	RBM3_RAT	Rbm3	Putative RNA-binding protein 3	p90: abs	-	Nc, Cp	5	-	70	16845	6.92	6
744	P60892	PRPS1_RAT	Prps1	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1	p7: abs	-	Cts	6	-	152	35325	6.51	16
603	D4AE41	RMXL1_RAT	Rbmx11	RNA binding motif protein, X-linked-like-1	p90: abs	-	Nc	4	-	91	42281	9.84	15
1028	D3ZL34	D3ZL34_RAT	Sfrs3	Serine/arginine-rich splicing factor 3	p90: abs	-	Nc, Np	5	-	89	14422	10.1	6
907	P36876	2ABA_RAT	Ppp2r2a	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B alpha isoform	down	-	Cts	6	3.2	72	52159	5.82	10 +
608	Q5XIG8	STRAP_RAT	Strap	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	up	-	Cp, Nc	6	0.5	151	38717	4.99	14
359/952	Q6P799	SYSC_RAT	Sars	Serine-tRNA ligase	up	-	Cp	6	0.5	100	59064	5.86	11 +
940/165	Q4KLI7	Q4KLI7_RAT	Sf3a3	Splicing factor 3a, subunit 3, 60kDa	up	up	Nc, Scc	5	0.2	144	59147	5.23	18
61	G3V8T5	G3V8T5_RAT	Ruvbl2	48 kDa TBP-interacting protein	-	up	Nc, Cp	5	0.4	210	51252	5.49	25 +
78	Q68A21	PURB_RAT	Purb	Transcriptional activator protein Pur-beta	-	p637: abs	Nc	4	-	72	33512	5.35	9 +
Proteine Signaltransduktion													
757,858	P62260	1433E_RAT	Ywhae	14-3-3 protein epsilon	up	-	Cp, Mel	6	0.5	186	29326	4.63	31 +
764	P68255	1433T_RAT	Ywhaq	14-3-3 protein theta	up	-	Cp	6	0.4	174	27925	4.73	29 +
764/1225,1226	P63102	1433Z_RAT	Ywhaz	14-3-3 protein zeta/delta	up	down	Cp, Mel	6	0.4	120	28046	4.69	24 +
1261	P62994	GRB2_RAT	Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2	down	-	Nc, Cp	6	2.4	131	25304	5.89	15
1184	P04897	GNAI2_RAT	Gnai2	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	up	-	Cp, M	6	0.6	124	41043	5.28	13
804	P63245	GBLP_RAT	Gnb2l1	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	up	-	M, Cp	6	0.3	201	35511	7.6	20
774/542	P63086	MK01_RAT	Mapk1	Mitogen-activated protein kinase 1	down	up	Nc, Cp	6	2.3	233	41648	6.5	22
1180	P08523	OMP_RAT	Omp	Olfactory marker protein	down	-	Cp	6	20.0	93	18841	5.12	11
1225	P35213	1433B_RAT	Ywhab	14-3-3 protein beta/alpha	-	down	Cp, Mel	6	4.4	182	28151	4.81	21 +
78	P59215	GNAO_RAT	Gnao1	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha	-	p637: abs	M, hGc	4	-	66	40613	5.34	10 +
Proteine Regulation													
521	Q62703	RCN2_RAT	Rcn2	Reticulocalbin-2	up	-	ER	6	0.4	86	37410	4.27	8
480,709	Q64640	ADK_RAT	Adk	Adenosine kinase	up	-	Cts, Nc	6	0.2	141	40450	5.72	17 +
656	P14669	ANXA3_RAT	Anxa3	Annexin A3	down	-	Cp, M	6	2.4	257	36569	5.96	21

Anhang: Ergebnistabellen

1219	P14668	ANXA5_RAT	Anxa5	Annexin A5	down	down	Cp, M	6	2.1	202	35779	4.93	17	
1279	P27139	CAH2_RAT	Ca2	Carbonic anhydrase 2	down	-	Cp	6	3.7	149	29267	6.89	15	
845	P45592	COF1_RAT	Cfl1	Cofilin-1	up	-	Nm, Cp	6	0.2	88	18749	8.22	11	
1197	Q6P7Q4	LGUL_RAT	Glo1	Lactoylglutathione lyase	down	-	Cp	6	1.7	123	20977	5.12	9	
523	P07936	NEUM_RAT	Gap43	Neuromodulin	up	-	M	6	0.2	113	23703	4.61	8	
575/114	P50398	GDIA_RAT	Gdi1	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	up	up	Cp	4	0.3	169	51074	5	27	+
464	P50399	GDIB_RAT	Gdi2	Rab GDP dissociation inhibitor beta	up	-	Cp, M	6	0.6	285	51018	5.93	29	
683	P62138	PP1A_RAT	Ppp1ca	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	up	-	Cp, Nc	6	0.4	179	38229	5.94	12	
520	Q63945	SET_RAT	Set	SET nuclear oncogene	up	-	Cp, ER, Nc	6	0.3	130	33386	4.22	10	
1188	B0BNJ1	B0BNJ1_RAT	Sri	Sorcিন	p7: abs	-	Cp, M	4	-	152	21952	5.54	10	
673	P70566	TMOD2_RAT	Tmod2	Tropomodulin-2	up	-	Cp, Csk	6	0.6	172	39468	5.34	13	
746	D4A711	D4A711_RAT	Cab39	Calcium binding protein 39	-	p637: abs	Cp, Cts	6	-	149	40019	6.43	11	
1025	P18666	ML12B_RAT	My112b	Myosin regulatory light chain 12B	-	p90: abs	Cts	5	-	70	19883	4.78	6	
5	F1LRG8	F1LRG8_RAT	Rsph1	Radial spoke head 1 homolog	-	up	Nc, Cts	6	0.3	87	32716	4.66	8	
1209	Q5XI73	GDIR1_RAT	Arhgdia	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	-	down	Cp	6	2.9	159	23450	5.12	18	
Chaperone														
923	P06761	GRP78_RAT	Hspa5	Heat shock 70kDa protein 5	up	-	ER, Mel	6	0.5	85	72473	5.07	15	+
239,240,312,302	P63018	HSP7C_RAT	Hspa8	Heat shock cognate 71 kDa protein	up	-	Cp, Mel	6	0.3	200	71055	5.37	30	+
380/247	P11598	PDIA3_RAT	Pdia3	Protein disulfide-isomerase A3	up	p637: abs	ER, Mel	6	0.5	297	57044	5.88	29	
923	P38659	PDIA4_RAT	Pdia4	Protein disulfide-isomerase A4	up	-	ER, Mel	6	0.5	105	73017	4.98	25	+
281	Q68FQ0	TCPE_RAT	Cct5	T-complex protein 1 subunit epsilon	up	-	Cp, Cts	6	0.5	216	59955	5.51	34	
154	Q07439	HSP71_RAT	Hspa1a	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	-	p90: abs	Cp	6	-	291	70427	5.61	32	
448	P82995	HS90A_RAT	Hsp90aa1	Heat shock protein HSP 90-alpha	-	up	Cp, Mel	6	0.3	262	83571	4.97	43	+
448	P34058	HS90B_RAT	Hsp90ab1	Heat shock protein HSP 90-beta	-	up	Cp, Mel	6	0.3	181	85161	4.93	38	+
904	Q5XIM9	TCPB_RAT	Cct2	T-complex protein 1 subunit beta	-	down	Cp	6	2.2	212	57764	6.01	25	

Anhang: Ergebnistabellen

Strukturproteine														
710,827/70	P60711	ACTB_RAT	Actb	Actin, cytoplasmic 1	up	up	Cp, Csk	6	0.2	94	42052	5.29	8	+
491	Q5M7U6	ARP2_RAT	Actr2	Actin-related protein 2	up	-	Cp, Csk	6	0.3	124	44990	6.3	21	
253/940,949	P47942	DPYL2_RAT	Dpysl2	Dihydropyrimidinase-related protein 2	up	-	Cp	5	0.2	205	62638	5.95	23	
952/963	Q62952	DPYL3_RAT	Dpysl3	Dihydropyrimidinase-related protein 3	up	-	Cp, Gc	6	0.5	141	62327	6.04	18	
425,456	Q9JHU0	DPYL5_RAT	Dpysl5	Dihydropyrimidinase-related protein 5	up	-	Cp	5	0.2	179	62071	6.6	18	
655	B2GUZ5	CAZA1_RAT	Capza1	F-actin-capping protein subunit alpha-1	up	-	Cp, Csk	6	0.5	205	33060	5.43	15	
239,240/183	P70615	LMNB1_RAT	Lmnb1	Lamin-B1	up	down	Nc, La	6	0.3	244	66794	5.16	50	+
565	D4A6B2	D4A6B2_RAT	Immt	Mitochondrial inner membrane protein	down	-	Mito, Mim	6	3.3	367	83104	5.34	45	+
1122/99	P30009	MARCS_RAT	Marcks	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	up	up	Cp, M, La	5	0.2	92	29834	4.32	6	
169	P19527	NFL_RAT	Nefl	Neurofilament light polypeptide	down	-	Nf, A	6	6.2	303	61355	4.63	35	
367	P12839	NFM_RAT	Nefm	Neurofilament medium polypeptide	down	-	Nf, Csk, A	6	3.8	229	95848	4.77	37	
849	B3GNI6	SEP11_RAT	Sept11	Septin-11	down	down	Cp, A	6	2.4	183	50005	6.24	19	
229	B0BNF1	SEPT8_RAT	Sept8	Septin-8	down	-	Cp, Csk	6	4.3	104	51562	5.74	14	
834,835	P13668	STMN1_RAT	Stmn1	Stathmin	up	-	Cp, Csk	6	0.1	128	17278	5.76	11	
859	Q63610	TPM3_RAT	Tpm3	Tropomyosin alpha-3 chain	p90: abs	-	Cp, Csk	5	-	187	29217	4.75	20	
858	P09495	TPM4_RAT	Tpm4	Tropomyosin alpha-4 chain	up	-	Cp, Csk	6	0.5	80	28549	4.66	11	+
61	P47819	GFAP_RAT	Gfap	Glial fibrillary acidic protein	-	up	Cp	5	0.4	118	49984	5.35	17	+
854	B5DFG5	B5DFG5_RAT	Sept6	Septin-6	-	down	Cr, Cp	6	1.7	198	49147	6.23	19	
110	P68370	TBA1A_RAT	Tuba1a	Tubulin alpha-1A chain	-	up	Cp, Csk	6	0.5	211	50788	4.94	32	+
110	Q4QRB4	TBB3_RAT	Tubb3	Tubulin beta-3 chain	-	up	Cp, Csk	6	0.5	198	50842	4.82	36	+
110	B4F7C2	B4F7C2_RAT	Tubb4	Tubulin, beta 4A class IVa	-	up	Cp, MT	6	0.5	192	50010	4.78	35	+
113,114,165	P31000	VIME_RAT	Vim	Vimentin	-	up	Nm, Cp	5	0.6	500	53757	5.06	62	+
Transportproteine														
460	P85515	ACTZ_RAT	Actr1a	Alpha-centractin	up	-	Cp, Cts	6	0.5	214	42701	6.19	19	
37	P85969	SNAB_RAT	Napb	Beta-soluble NSF attachment protein	down	-	M	6	1.7	204	33791	5.32	15	

Anhang: Ergebnistabellen

837	P62966	RABP1_RAT	Crabp1	Cellular retinoic acid-binding protein 1	up	-	Cp	5	0.3	152	15753	5.3	12	
251	Q62871	DC1I2_RAT	Dync1i2	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	up	-	Cp, Csk	4	0.5	66	71533	5.11	10	
833	P55051	FABP7_RAT	Fabp7	Fatty acid-binding protein, brain	up	-	Cp	6	0.1	90	15140	5.46	8	
844	P55053	FABP5_RAT	Fabp5	Fatty acid-binding protein, epidermal	up	-	Cp	5	0.1	152	15335	6.73	14	+
601	O35987	NSF1C_RAT	Nsfl1c	NSFL1 cofactor p47	p90: abs	-	Nc, Golgi	5	-	191	40655	5.04	17	
336,352	P02770	ALBU_RAT	Alb	Serum albumin	up	-	Sc	6	0.5	333	70682	6.09	42	
883	Q9QUL6	NSF_RAT	Nsf	Vesicle-fusing ATPase	down	-	Cp	6	2.2	253	83170	6.55	27	
737,743	P81155	VDAC2_RAT	Vdac2	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	down	-	Mom	6	6.7	107	32353	7.44	9	
555	Q99MS0	S14L2_RAT	Sec14l2	Alpha-tocopherol-associated protein	-	up	Cp, Nc	5	0.5	64	46593	7.04	10	+
253	D4A133	D4A133_RAT	Atp6v1a	ATPase, H+ transporting, lysosomal 70kDa, V1 subunit A	-	down	Mito, Cts	6	1.8	94	68564	5.42	14	
1220	P47728	CALB2_RAT	Calb2	Calretinin	-	down	Cp, Gj	4	1.7	152	31498	4.94	20	

7.6.2 Ergebnistabelle des Cerebellums**7.6.2 Tab. A1 (b): Ergebnistabelle des Ce.**

SpotID	Accession	Entry name	Gene name	Funkt. Gruppe/Protein Name	Regulation [P7]	Regulation [P637]	zell. Lokalisation	H	Kontrolle/ PD (P90/P7, P637)	Score	MW	pl	Qm (*)
Proteine Kohlenstoffmetabolismus					(SVQ ≤0.6)	(SVQ ≥1.67)							
626/650	P51635	AK1A1_RAT	Akr1a1	Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]	up	up	Cts, M	6	0.53	162	36711	6.84	19 +
683,689,694/641	P09117	ALDOC_RAT	Aldoc	Fructose-bisphosphate aldolase C	down	up	Cp, Mito, A	6	3.61	316	39658	6.67	26 +
332	P08461	ODP2_RAT	Dlat	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	-	up	Mmt	5	0.32	241	67637	8.76	28
96	P04764	ENOA_RAT	Eno1	Alpha-enolase	down	-	Cp, M	5	1.90	107	47440	6.16	12
41	P07323	ENOG_RAT	Eno2	Gamma-enolase	down	-	Cp, M	6	2.22	272	47510	5.03	32
1031	P04797	G3P_RAT	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	down	-	Cp, Nc	6	3.09	262	36090	8.14	34
626	D3ZAP9	D3ZAP9_RAT	Gpd1l	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like	up	-	Cp	6	0.53	62	38726	6.61	10 +
615/571	O88989	MDHC_RAT	Mdh1	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	down	up	Cp	6	3.24	126	36631	6.16	16 +
1214	P04636	MDHM_RAT	Mdh2	Malate dehydrogenase, mitochondrial	-	up	Mmt	5	0.49	242	36117	8.93	24
622/661	B1WC26	B1WC26_RAT	Nans	N-acetylneuraminic acid synthase	up	up	Cp, Cts	6	0.56	105	40482	6.39	13 +
859	Q5XI78	ODO1_RAT	Ogdh	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	down	-	Mmt	4	1.93	158	11741	6.3	18
12	P49432	ODPB_RAT	Pdhb	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	down	-	Mmt	6	5.80	139	39299	6.2	18
693	P16617	PGK1_RAT	Pgk1	Phosphoglycerate kinase 1	-	down	Cp	4	3.50	214	44909	8.02	29 +
404	D3Z955	D3Z955_RAT	Pgm2l1	Phosphoglucomutase 2-like 1	up	-	Cts	6	0.52	126	71102	6.09	17
739,740	P11980	KPYM_RAT	Pkm2	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	down	-	Cp, Nc	6	4.71	412	58294	6.63	44 +
276	P53534	PYGB_RAT	Pygb	Glycogen phosphorylase, brain form	-	up	Cp	4	0.11	93	96854	6.24	19 +
32/555	B2RZ24	B2RZ24_RAT	Suc1a2	Succinyl-CoA synthetase beta-A chain	down	up	Mito, Mmt	6	3.40	172	47700	6.06	20 +
748	P50137	TKT_RAT	Tkt	Transketolase	down	-	Nc	6	2.09	339	68342	7.23	35
1188	P48500	TPIS_RAT	Tpi1	Triosephosphate isomerase	-	up	Nc, Cts	5	0.37	161	27345	6.89	16 +

Anhang: Ergebnistabellen

Proteine Aminosäuremetabolismus														
642	Q6AYS7	ACY1A_RAT	Acy1a	Aminoacylase-1A	down	-	Cp	4	2.93	180	46060	6.03	21	+
747,748	Q99JD5	Q99JD5_RAT	Bcat1	Branched-chain-amino-acid aminotransferase	p90: abs	-	Cp	4	-	60	45312	5.46	6	+
98	Q6Q0N1	CNDP2_RAT	Cndp2	Cytosolic non-specific dipeptidase	-	up	Cp	5	0.48	205	53116	5.43	29	
664,680	P09606	GLNA_RAT	Glul	Glutamine synthetase	down	-	Cp, Mito	6	8.04	257	42982	6.64	31	+
446	Q4V7C6	GUAA_RAT	Gmps	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	up	-	Cp	5	0.52	130	77507	6.21	17	
694	P13221	AATC_RAT	Got1	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	down	-	Cp	4	3.91	303	46628	6.73	34	+
801	P14882	PCCA_RAT	Pcca	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial	down	-	Mmt	5	2.14	262	82198	7.59	32	
Proteine Fettmetabolismus														
661	Q5XI22	THIC_RAT	Acat2	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	-	up	Cp	4	0.42	180	41538	6.86	16	
777	P30349	LKHA4_RAT	Lta4h	Leukotriene A-4 hydrolase	down	-	Cp	6	1.98	149	69759	5.69	25	+
1029	O35263	PA1B3_RAT	Pafah1b3	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma	up	-	Cp	6	0.27	135	25961	6.42	11	
623	Q568Z9	PHYIP_RAT	Phyhip	Phytanoyl-CoA hydroxylase-interacting protein	up	-	Pers	4	0.54	160	38101	6.53	17	+
Proteine Energiemetabolismus														
743/712	P15999	ATPA_RAT	Atp5a1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	down	up	Mim, M	5	3.49	295	59831	9.22	38	
945	P31399	ATP5H_RAT	Atp5h	ATP synthase subunit d, mitochondrial	down	-	Mito, Mm	6	2.70	148	18809	6.17	13	
27,28,32,33	P07335	KCRB_RAT	Ckb	Creatine kinase B-type	down	down	Cp	6	4.05	317	42983	5.39	35	+
693	P25809	KCRU_RAT	Ckmt1	Creatine kinase U-type, mitochondrial	down	down	Mim, M	4	2.41	193	47398	8.72	21	+
660	Q561S0	NDUAA_RAT	Ndufa10	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	down	-	Mmt	4	3.09	261	40753	7.64	21	+
272,279	Q66HF1	NDUS1_RAT	Ndufs1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	down	down	Mim	5	3.25	320	80331	5.65	39	+
644	Q641Y2	NDUS2_RAT	Ndufs2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	down	-	Mim	6	2.46	247	52927	6.52	31	
943	D3ZG43	D3ZG43_RAT	Ndufs3	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) Fe-S protein 3 (Predicted), isoform CRA_c	down	-	Mito, Mm	6	3.29	280	20190	6.32	21	
916	P19234	NDUV2_RAT	Ndufv2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	down	-	Mim	5	2.48	138	27703	6.23	13	

Anhang: Ergebnistabellen

Proteine Degradation													
1024	P60901	PSA6_RAT	Psma6	Proteasome subunit alpha type-6	up	-	Cp, Nc	6	0.48	173	27838	6.34	16
1019	P40112	PSB3_RAT	Psemb3	Proteasome subunit beta type-3	up	-	Cp, Nc	5	0.27	124	23234	6.15	12 +
1014	D4A640	D4A640_RAT	Psemb4	Proteasome subunit beta type	up	-	Cp, Nc	6	0.56	102	25858	5.97	7
1025	Q9JHW0	PSB7_RAT	Psemb7	Proteasome subunit beta type-7	up	-	Cp, Nc	6	0.44	120	30250	8.13	10
691	Q4V8E2	Q4V8E2_RAT	Psmc14	Proteasome (Prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 14	up	-	P, Np	4	0.56	64	34726	6.06	7 +
624	D4AEH3	D4AEH3_RAT	Psmc7	Proteasome (Prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 7	up	-	P, Np	5	0.27	102	36526	6.33	14 +
276	D3ZVQ0	D3ZVQ0_RAT	Usp5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	-	up	Lyso	4	0.11	136	96631	4.89	23 +
Proteine Antioxidantia													
725	O08557	DDAH1_RAT	Ddah1	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	up	-	Mito, Cp	5	0.44	283	31805	5.75	26 +
951	Q9Z1B2	GSTM5_RAT	Gstm5	Glutathione S-transferase Mu 5	down	-	Cp	6	2.92	232	27067	6.33	22
956	Q9Z339	GSTO1_RAT	Gsto1	Glutathione S-transferase omega-1	down	-	Cp, Cts	6	2.27	81	27936	6.25	10
949	Q9Z0V6	PRDX3_RAT	Prdx3	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	down	-	Mito	6	1.87	72	28563	7.14	8
947	O35244	PRDX6_RAT	Prdx6	Peroxisome oxidoreductin-6	down	-	Cp, Lyso	6	3.75	207	24860	5.64	18
Proteine Biosynthese													
746	Q6P7P5	BZW1_RAT	Bzw1	Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1	up	-	Cp	4	0.52	77	48184	5.75	10
1015	Q4KM73	KCY_RAT	Cmpk1	UMP-CMP kinase	up	-	Nc, Cp	6	0.55	149	22383	5.66	10
676,683	P15178	SYDC_RAT	Dars	Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic	up	-	Cp	6	0.30	83	57546	6.02	15 +
715	P62630	EF1A1_RAT	Eef1a1	Elongation factor 1-alpha 1	up	-	Cp, Nc	5	0.44	73	50424	9.1	10
670	Q68FR6	EF1G_RAT	Eef1g	Elongation factor 1-gamma	up	-	Rs, Cts	6	0.37	235	50371	6.31	27
779	Q6P3V8	Q6P3V8_RAT	Eif4a1	Eukaryotic translation initiation factor 4A1	p90: abs	-	Cts	6	-	91	46353	5.32	19 +
34	Q5RKI1	IF4A2_RAT	Eif4a2	Eukaryotic initiation factor 4A-II	-	down	Cts	5	5.16	196	46601	5.33	28
837	Q32PX7	FUBP1_RAT	Fubp1	Far upstream element-binding protein 1	down	-	Nc	5	1.78	97	67326	7.18	10
1067	A7VJC2	ROA2_RAT	Hnrnpa2b1	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	-	down	Nc, Cp	5	3.03	228	37512	8.97	24 +
860	Q794E4	HNRPF_RAT	Hnrnpf	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	up	-	Nc, Np	4	0.11	158	46043	5.31	21 +

Anhang: Ergebnistabellen

635	Q6AY09	HNRH2_RAT	Hnrnph2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	-	up	Nc, Np	5	0.42	194	49547	5.89	28	
246	P61980	HNRPK_RAT	Hnrnpk	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	up	-	Cp, Nc	5	0.48	129	51230	5.39	20	+
92,630	G3V9Q3	G3V9Q3_RAT	Hnrph1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1, isoform CRA_b	down	-	Nc, Cp	6	5.96	104	49454	5.89	18	+
601	P85973	PNPH_RAT	Pnp	Purine nucleoside phosphorylase	up	-	Cp	6	0.59	263	32566	6.46	31	
624	E9PT51	E9PT51_RAT	Poldip2	delta interacting protein 2	-	up	?	5	0.27	111	42287	8.62	15	+
11	P62716	PP2AB_RAT	Ppp2cb	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform	-	down	Cp, Nc, Cr	4	2.41	169	36123	5.21	16	
772	P53042	PPP5_RAT	Ppp5c	Serine/threonine-protein phosphatase 5	down	-	Nc	5	2.37	159	57507	5.84	18	
246	D3ZVP6	D3ZVP6_RAT	Ppwd1	Peptidylprolyl isomerase domain and WD repeat containing 1	up	-	Nc	5	0.48	129	51230	5.39	20	+
651	F1LPS8	F1LPS8_RAT	Pura	Transcriptional activator protein Pur-alpha	down	down	Nc, Cp	6	1.70	73	34976	6.07	12	
1060	Q925G0	RBM3_RAT	Rbm3	Putative RNA-binding protein 3	down	-	Nc, Cp	5	1.87	73	16845	6.92	5	
726	P19945	RLA0_RAT	Rplp0	60S acidic ribosomal protein P0	p90: abs	-	Nc, Cp	5	-	197	34365	5.91	19	+
828,47	P38983	RSSA_RAT	Rpsa	40S ribosomal protein SA	up	down	M, Cp, Nc	5	0.16	125	32918	4.8	10	+
369	Q6P799	SYSC_RAT	Sars	Serine--tRNA ligase, cytoplasmic	up	-	Cp	4	0.60	112	59064	5.86	19	+
240	Q4KLI7	Q4KLI7_RAT	Sf3a3	Splicing factor 3a, subunit 3, 60kDa	up	-	Nc, Scc	6	0.50	180	59147	5.23	23	+
804	D4A9L2	D4A9L2_RAT	Srsf1	Serine/arginine-rich splicing factor 1	p90: abs	-	Nc, Cp	4	-	143	27842	10.3	16	+
821/635	Q5XIG8	STRAP_RAT	Strap	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	up	up	Cp, Nc	6	0.38	141	38717	4.99	15	
507/747	Q4KM49	SYYC_RAT	Yars	Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic	up	up	Cp	5	0.57	141	59420	6.57	18	
852	P62961	YBOX1_RAT	Ybx1	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	up	-	Cp, Nc, Cpg	5	0.52	219	35709	9.87	16	
Proteine Signaltransduktion														
23,25	P82471	GNAQ_RAT	Gnaq	Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha	down	-	Nc, M	4	1.89	134	42402	5.48	11	+
55	P54311	GBB1_RAT	Gnb1	Guanine nucleotide-binding protein G(i)/G(s)/G(t) subunit beta-1	-	up	M, hGc	5	0.31	146	38151	5.6	18	+
55	P54313	GBB2_RAT	Gnb2	Guanine nucleotide-binding protein G(i)/G(s)/G(t) subunit beta-2	-	up	M, Cp	5	0.31	160	38048	5.6	19	+
968,924	P97697	IMPA1_RAT	Impa1	Inositol monophosphatase 1	up	-	Cp	6	0.48	214	30834	5.17	16	
951	P62260	1433E_RAT	Ywhae	14-3-3 protein epsilon	up	-	Cp, Mel	6	0.51	213	29326	4.63	34	
930,932,982	P68511	1433F_RAT	Ywhah	14-3-3 protein eta	down	down	Cp	4	2.75	120	28365	4.81	22	+
930	P68255	1433T_RAT	Ywhaq	14-3-3 protein theta	down	down	Cp	4	2.75	125	28046	4.69	24	+

Anhang: Ergebnistabellen

930,932	P63102	1433Z_RAT	Ywhaz	14-3-3 protein zeta/delta	up	down	Cp, Mel	4	2.75	142	27925	4.73	29	+
Proteine Regulation														
634	Q64640	ADK_RAT	Adk	Adenosine kinase	down	-	Cts, Nc	6	4.50	129	40450	5.72	13	
788	Q02589	ADPRH_RAT	Adprh	[Protein ADP-ribosylarginine] hydrolase	up	-	Cp	5	0.31	111	40220	5.62	12	
626	Q07936	ANXA2_RAT	Anxa2	Annexin A2	up	-	M, Mel	6	0.53	71	38939	7.55	12	
939	P14668	ANXA5_RAT	Anxa5	Annexin A5	down	-	Cp, M	6	3.25	143	35779	4.93	17	+
571	Q9R1T5	ACY2_RAT	Aspa	Aspartoacylase	-	up	Cp, Nc	5	0.53	109	35747	5.95	14	+
1188	B5DF65	B5DF65_RAT	Blvrb	Biliverdin reductase B (Flavin reductase (NADPH))	-	up	Cp, Cts	5	0.37	96	22194	6.29	12	+
962	P27139	CAH2_RAT	Ca2	Carbonic anhydrase 2	down	-	Cp	6	5.01	89	29267	6.89	11	
1063	P45592	COF1_RAT	Cfl1	Cofilin-1	up	-	Nm, Cp	5	0.56	154	18749	8.22	16	
4	P08082	CLCB_RAT	Cltb	Clathrin light chain B	down	down	Cpv, M	4	2.31	104	25216	4.56	8	
571	Q4KM69	Q4KM69_RAT	Cops5	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 5	-	up	Nc, Cp	5	0.53	121	37783	6.1	15	+
939	Q4FZY0	EFHD2_RAT	Efhd2	EF-hand domain-containing protein D2	down	-	M	6	3.25	147	26743	5.01	15	+
967	B0BNE5	ESTD_RAT	Esd	S-formylglutathione hydrolase	down	-	Cp, Cpv	5	1.86	181	31971	6.44	15	
851	P07936	NEUM_RAT	Gap43	Neuromodulin	up	-	M	6	0.11	95	23703	4.61	7	
706	P50399	GDIB_RAT	Gdi2	Rab GDP dissociation inhibitor beta	up	-	Cp, M	6	0.52	311	51018	5.93	38	
1085	Q63228	GMFB_RAT	Gmfb	Glia maturation factor beta	up	-	Cp	6	0.13	78	16897	5.32	6	
912	P62749	HPCL1_RAT	Hpcal1	Hippocalcin-like protein 1	down	-	Pem	6	1.96	202	22438	5.32	17	
944	O88767	PARK7_RAT	Park7	Protein DJ-1	down	-	Cp, Nc, Mito	6	1.74	280	20190	6.32	21	
240	Q5FVJ0	RUFY3_RAT	Rufy3	Rap2-interacting protein x	up	-	Gc	6	0.50	87	53158	5.36	16	+
849,1	Q63945	SET_RAT	Set	SET nuclear oncogene	up	down	Cp, ER, Nc	6	0.33	102	33386	4.22	8	+
779	Q6AYE2	SHLB1_RAT	Sh3glb1	Endophilin-B1	p90: abs	-	Cp, Golgi, Mom	4	-	62	41047	5.78	9	+
1002	P37377	SYUA_RAT	Sncac	Alpha-synuclein	down	down	Cp	6	4.64	67	14506	4.74	5	+
91	B2RYI6	B2RYI6_RAT	Snx4	Snx4 protein	-	p90: abs	Cp	4	-	88	52194	5.6	18	+
805	Q1RP74	Q1RP74_RAT	Tbcb	Tubulin folding cofactor B	up	-	Nc, Cp, MT	5	0.32	196	27515	4.93	17	
20	P70566	TMOD2_RAT	Tmod2	Tropomodulin-2	down	-	Cp, Csk	6	3.39	185	39468	5.34	15	

Anhang: Ergebnistabellen

990	P63029	TCTP_RAT	Tpt1	Translationally-controlled tumor protein	up	-	Cp	5	0.29	135	19564	4.76	10	
1082	P11232	THIO_RAT	Txn	Thioredoxin	up	-	Nc, Cp, Sc	6	0.24	67	12008	4.8	4	
808	Q920J4	TXNL1_RAT	Txnl1	Thioredoxin-like protein 1	up	-	Cp	4	0.19	257	32628	4.84	19	
466/752,754	Q5RKI0	WDR1_RAT	Wdr1	WD repeat-containing protein 1	up	down	Cp, Csk	5	0.48	315	66824	6.15	33	+
Chaperone														
42,139	P18418	CALR_RAT	Calr	Calreticulin	up	down	ER	6	0.60	230	48137	4.33	24	+
683,686	Q5XIM9	TCPB_RAT	Cct2	T-complex protein 1 subunit beta	up	-	Cp	6	0.38	336	57764	6.01	41	+
918	Q6P502	TCPG_RAT	Cct3	T-complex protein 1 subunit gamma	-	up	Cp	5	0.33	210	61179	6.23	31	
252/130	Q68FQ0	TCPE_RAT	Cct5	T-complex protein 1 subunit epsilon	up	up	Cp, Cts	5	0.31	329	59955	5.51	43	
1192	P52555	ERP29_RAT	Erp29	Endoplasmic reticulum resident protein 29	-	up	ER, Mel	5	0.55	130	28614	6.23	15	+
38,102	P82995	HS90A_RAT	Hsp90aa1	Heat shock protein HSP 90-alpha	up	-	Cp, Mel	6	0.44	108	85161	4.93	16	+
434	P34058	HS90B_RAT	Hsp90ab1	Heat shock protein HSP 90-beta	down	down	Cp, Mel	6	2.39	260	83571	4.97	42	
360	O88600	HSP74_RAT	Hspa4	Heat shock 70 kDa protein 4	down	down	Cp	5	1.68	233	94795	5.13	43	+
145	P06761	GRP78_RAT	Hspa5	Heat shock 70kDa protein 5	down	down	ER, Mel	6	3.49	315	72474	5.07	34	
326	P63018	HSP7C_RAT	Hspa8	Heat shock cognate 71 kDa protein	-	up	Cp, Mel	5	0.58	215	71055	5.37	37	+
246	P63039	CH60_RAT	Hspd1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	up	-	Mmt	5	0.48	66	61088	5.91	16	+
773	P11598	PDIA3_RAT	Pdia3	Protein disulfide-isomerase A3	down	down	ER, Mel	5	1.79	73	57044	5.88	8	
Strukturproteine														
643	B2RYJ7	B2RYJ7_RAT	Actr1b	ARP1 actin-related protein 1 homolog B (Yeast)	down	-	Cp, Csk	6	1.77	173	42369	5.98	18	
760	Q4V7C7	ARP3_RAT	Actr3	Actin-related protein 3	up	-	Cp, Csk	6	0.52	230	47783	5.61	27	
790	B2GUZ5	CAZA1_RAT	Capza1	F-actin-capping protein subunit alpha-1	up	-	Cp, Csk	6	0.57	230	33060	5.43	19	
737	Q5XI32	CAPZB_RAT	Capzb	F-actin-capping protein subunit beta	up	-	Cp, Csk	6	0.57	184	30952	5.69	20	
529	P21575	DYN1_RAT	Dnm1	Dynammin-1	down	down	Cp, Csk	6	3.65	246	97576	6.44	36	+
318,752,760,765,777/134,1017	P47942	DPYL2_RAT	Dpysl2	Dihydropyrimidinase-related protein 2	down	up	Cp	6	3.14	321	62638	5.95	33	+
369	Q62952	DPYL3_RAT	Dpysl3	Dihydropyrimidinase-related protein 3	up	-	Cp, Gc	4	0.60	181	62327	6.04	27	+

Anhang: Ergebnistabellen

609,676/588	P85845	FSCN1_RAT	Fscn1	Fascin	up	up	Cp, Csk	6	0.44	201	55198	6.29	25	+
60	P47819	GFAP_RAT	Gfap	Glial fibrillary acidic protein	down	-	Cp	6	5.72	381	49984	5.35	48	
444	D4A6B2	D4A6B2_RAT	Immt	Mitochondrial inner membrane protein	down	-	Mito, Mim	6	2.58	375	83104	5.34	46	
123	P23565	AINX_RAT	Ina	Alpha-intermexin	down	-	Nf	6	1.92	391	56253	5.2	45	
44	P30009	MARCS_RAT	Marcks	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	up	-	Cp, M, La	6	0.40	109	29834	4.32	9	
187	P19527	NFL_RAT	Nefl	Neurofilament light polypeptide	down	-	Nf, A	6	3.49	412	61355	4.63	53	
580	P12839	NFM_RAT	Nefm	Neurofilament medium polypeptide	down	-	Nf, Csk, A	5	2.84	291	95848	4.77	48	
1060	B3GN16	SEP11_RAT	Sept11	Septin-11	down	down	Cp, A	5	1.87	69	50005	6.24	11	
651	Q9JMM9	SEPT5_RAT	Sept5	Septin-5	down	down	Cp, Csk	6	1.70	208	43281	6.34	27	+
92	B0BNF1	SEPT8_RAT	Sept8	Septin-8	down	-	Cp, Csk	6	5.96	149	51562	5.74	23	+
1113	P13668	STMN1_RAT	Stmn1	Stathmin	up	-	Cp, Csk	6	0.04	171	17278	5.76	14	
185	Q6P9V9	TBA1B_RAT	Tuba1b	Tubulin alpha-1B chain	-	up	Cp, Csk	4	0.14	203	50804	4.94	32	+
21	Q6AYZ1	TBA1C_RAT	Tuba1c	Tubulin alpha-1C chain	down	-	Cp, Csk	4	3.73	87	50590	4.96	8	
921	Q3KRE8	TBB2B_RAT	Tubb2b	Tubulin beta-2B chain	up	-	Cp, Csk	5	0.48	317	50377	4.78	42	
185	Q4QRB4	TBB3_RAT	Tubb3	Tubulin beta-3 chain	-	up	Cp, Csk	4	0.14	179	50842	4.82	34	+
Transportproteine														
383,384	P02770	ALBU_RAT	Alb	Serum albumin	up	-	Sc	6	0.26	376	70682	6.09	44	+
360	P62944	AP2B1_RAT	Ap2b1	AP-2 complex subunit beta	down	down	M	5	1.68	158	10539	5.22	30	+
817	Q5M7T6	Q5M7T6_RAT	Atp6v0d1	ATPase, H+ transporting, lysosomal 38kDa, V0 subunit d1	up	-	M	5	0.23	111	40731	4.89	11	
64,91	P62815	VATB2_RAT	Atp6v1b2	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	down	down	M, Mel	6	3.27	278	56857	5.57	31	+
932	P47728	CALB2_RAT	Calb2	Calretinin	down	-	Cp, Gj	5	4.87	76	31499	4.94	17	+
288	Q811Q2	CLIC6_RAT	Clic6	Chloride intracellular channel protein 6	down	down	Cp, M	6	2.43	204	64990	4.29	19	
889	Q6AYH5	DCTN2_RAT	Dctn2	Dynactin subunit 2	up	-	Cp, M	4	0.49	218	44235	5.14	21	
270	Q62871	DC1I2_RAT	Dync112	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	down	down	Cp, Csk	5	2.13	111	71533	5.11	11	
1079	P55051	FABP7_RAT	Fabp7	Fatty acid-binding protein, brain	up	-	Cp	6	0.21	152	15140	5.46	12	
15	P54921	SNAA_RAT	Napa	Alpha-soluble NSF attachment protein	down	-	M	6	4.31	300	33627	5.3	27	+

Anhang: Ergebnistabellen

15	P85969	SNAB_RAT	Napb	Beta-soluble NSF attachment protein	down	-	M	6	4.31	134	33791	5.32	15	+
235,832,835	Q9QUL6	NSF_RAT	Nsf	Vesicle-fusing ATPase	down	down	Cp	6	2.55	226	83170	6.55	33	
683	Q8VIF7	SBP1_RAT	Selenbp1	Selenium-binding protein 1	up	-	Nc, Cp	6	0.38	66	53069	6.1	13	+
1066	Q9Z2L0	VDAC1_RAT	Vdac1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	down	down	Mom, M	4	2.44	215	30851	8.62	17	
965	P81155	VDAC2_RAT	Vdac2	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	down	-	Mom	6	2.25	168	32353	7.44	15	

7.6.3 Ergebnistabelle des Cortex cerebri

7.6.3 Tab. A1 (c): Ergebnistabelle des Co.

SpotID	Accession	Entry name	Gene name	Funkt. Gruppe/Protein Name	Regulation [P7]	Regulation [P637]	zell. Lokalisation	H	Kontrolle/ PD (P90/P7,P637)	Score	MW	pl	Qm (*)
Proteine Kohlenstoffmetabolismus					(SVQ ≤ 0.6)	(SVQ ≥ 1.67)					(calc.)		
923	P51635	AK1A1_RAT	Akr1a1	Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]	up	-	Cts, M	6	0.57	207	36711	6.84	17
492	P07943	ALDR_RAT	Akr1b1	Aldose reductase	down	-	Cp	6	1.90	159	36230	6.26	14
274	P09117	ALDOC_RAT	Aldoc	Fructose-bisphosphate aldolase C	-	up	Cp, Mito, A	6	0.59	252	39658	6.67	24
359	P08461	ODP2_RAT	Dlat	Dihydropyridyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	down	-	Mmt	6	2.72	209	67637	8.76	23
341/5	Q01205	ODO2_RAT	Dlst	Dihydropyridyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	down	down	Mito	6	1.80	96	49236	8.89	15
539/294	P04764	ENOA_RAT	Eno1	Alpha-enolase	down	up	Cp, M	6	1.69	349	47440	6.16	37
15	P07323	ENOG_RAT	Eno2	Gamma-enolase	down	-	Cp, M	5	4.01	342	47510	5.03	35
763	P04797	G3P_RAT	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	down	-	Cp, Nc	6	2.22	250	36090	8.14	36
312	P42123	LDHB_RAT	Ldhb	L-lactate dehydrogenase B chain	down	-	Cp	6	2.66	307	36874	5.7	32
319	O88989	MDHC_RAT	Mdh1	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	down	-	Cp	6	4.08	153	36631	6.16	21
527/633	B1WC26	B1WC26_RAT	Nans	N-acetylneuraminic acid synthase	down	down	Cp, Cts	5	2.81	67	40482	6.39	8
520	P26284	ODPA_RAT	Pdha1	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	down	-	Mmt	6	2.30	255	43883	8.49	30
41	P49432	ODPB_RAT	Pdha2	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	down	-	Mmt	5	2.39	149	39299	6.2	21
754	P25113	PGAM1_RAT	Pgam1	Phosphoglycerate mutase 1	down	-	Nc, Cts	6	4.91	227	28928	6.67	23
519/422	P16617	PGK1_RAT	Pgk1	Phosphoglycerate kinase 1	down	down	Cp	6	4.26	129	47398	8.72	24
652	P11980	KPYM_RAT	Pkm2	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	down	-	Cp, Nc	6	12.97	385	58294	6.63	45
586,702	Q920L2	DHSA_RAT	Sdha	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	down	-	Mim	6	2.49	338	72596	6.75	30 +
326	B2RZ24	B2RZ24_RAT	Suca2	Succinyl-CoA synthetase beta-A chain	down	-	Mito, Mmt	6	5.35	249	47700	6.06	30
751	P48500	TPIS_RAT	Tpi1	Triosephosphate isomerase	down	-	Nc, Cts	6	4.51	196	27345	6.89	20
25	Q68FY0	QCR1_RAT	Uqcrc1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	down	-	Mim	6	6.72	215	53500	5.57	24

Anhang: Ergebnistabellen

Proteine Aminosäuremetabolismus													
556/324	P10860	DHE3_RAT	Glud1	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	down	up	Mmt	6	2.27	279	61719	8.05	39
521/280	P09606	GLNA_RAT	Glul	Glutamine synthetase	down	up	Cp, Mito	6	2.22	278	42982	6.64	33
198	F1M9V7	F1M9V7_RAT	Npepps	Aminopeptidase puromycin sensitive	-	up	Nc, Cp	6	0.57	117	103963	5.53	27
127	O09175	AMPB_RAT	Rnpep	Aminopeptidase B	-	down	Sc, Cp	5	2.26	178	73372	5.47	23
28	Q5RJQ4	SIR2_RAT	Sirt2	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2	p7: abs	-	Cp, Csk	4	-	269	39921	6.67	23 +
Proteine Fettmetabolismus													
518/329	Q5XI22	THIC_RAT	Acat2	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	down	down	Cp	6	2.22	74	41538	6.86	8
328	Q6P6R2	DLDH_RAT	Dld	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	-	up	Mmt	5	0.49	105	54574	7.96	16
154	P17425	HMCS1_RAT	Hmgcs1	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	up	-	Cp	5	0.35	191	58025	5.58	26
88	O35760	IDI1_RAT	Idi1	Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1	p90: abs	-	Per	5	-	115	26722	5.57	8
372	P30349	LKHA4_RAT	Lta4h	Leukotriene A-4 hydrolase	down	-	Cp	6	3.05	127	69759	5.69	18
442	O35264	PA1B2_RAT	Pafah1b2	Platelet-activating factor acetylhydrolase 1B subunit beta	-	up	Cp	6	0.51	89	25736	5.57	9
Proteine Energiemetabolismus													
657/748	P15999	ATPA_RAT	Atp5a1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	down	down	Mim, M	5	4.20	364	59831	9.22	41
741/521	P31399	ATP5H_RAT	Atp5h	ATP synthase subunit d, mitochondrial	down	down	Mito, Mim	6	4.07	165	18809	6.17	14
28,49	P07335	KCRB_RAT	Ckb	Creatine kinase B-type	down	-	Cp	6	2.70	175	42983	5.39	26 +
558/110	P25809	KCRU_RAT	Ckmt1	Creatine kinase U-type, mitochondrial	down	down	Mito, Mim	6	4.26	129	47398	8.72	24
153/141	Q66HF1	NDUS1_RAT	Ndufs1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	down	up	Mim	6	1.98	362	80331	5.65	44
330	Q641Y2	NDUS2_RAT	Ndufs2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	down	-	Mim	6	3.76	233	52927	6.52	31
729	D3ZG43	D3ZG43_RAT	Ndufs3	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) Fe-S protein 3 (Predicted), isoform CRA_c	down	-	Mito, Mm	5	1.99	187	30379	7.07	17
128	P19234	NDUV2_RAT	Ndufv2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	-	p637: abs	Mim	5	-	129	27703	6.23	12
750	P20788	UCRI_RAT	Uqcrcs1	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	down	-	Mim	6	4.51	63	29712	9.04	13
Proteine Degradation													

Anhang: Ergebnistabellen

48,56	P22062	PIMT_RAT	Pcmt1	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	p7: abs	-	Cp	5	-	60	24683	7.14	8	+
918/460	P60901	PSA6_RAT	PsmA6	Proteasome subunit alpha type-6	up	up	Cp, Nc	6	0.43	178	27838	6.34	19	
536	Q63347	PRS7_RAT	Psmc2	26S protease regulatory subunit 7	up	-	Cp, Nc	6	0.32	367	48943	5.59	38	
105	Q63570	PRS6B_RAT	Psmc4	26S protease regulatory subunit 6B	-	p637: abs	Cp, Nc	4	-	80	47493	5.09	10	
Proteine Antioxidantia														
778	Q9Z339	GSTO1_RAT	Gsto1	Glutathione S-transferase omega-1	down	-	Cp, Cts	6	1.74	78	27936	6.25	8	
66	P08009	GSTM4_RAT	Gstm3	Glutathione S-transferase Yb-3	p7: abs	-	Cp	5	-	267	25835	6.84	27	
716	P35704	PRDX2_RAT	Prdx2	Peroxiredoxin-2	down	-	Cp	6	2.05	108	21941	5.34	8	
713	O35244	PRDX6_RAT	Prdx6	Peroxiredoxin-6	down	-	Cp, Lyso	5	4.82	233	24860	5.64	18	
743/457	Q9Z0V6	PRDX3_RAT	Prdx3	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	down	up	Mito	5	2.56	88	28563	7.14	8	
Proteine Biosynthese														
400	O35567	PUR9_RAT	Atic	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	-	up	Mito, Cts	4	0.46	102	64681	6.69	13	
24,54	Q9Z1N4	BPNT1_RAT	Bpnt1	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1	-	up	Cts	6	0.48	62	33495	5.58	10	+
719	Q68FR6	EF1G_RAT	Eef1g	Elongation factor 1-gamma	up	-	Rs, Cts	5	0.50	176	50371	6.31	20	
658	Q510G4	SYG_RAT	Gars	Glycine--tRNA ligase	up	-	Cp, Mito	6	0.52	259	72669	5.76	31	
595	Q9WTT6	GUAD_RAT	Gda	Guanine deaminase	up	-	Cts	6	0.29	245	51554	5.56	33	
624,566	Q9JMJ4	PRP19_RAT	Prpf19	Pre-mRNA-processing factor 19	-	down	Nc, Cp	4	2.14	91	55661	6.14	11	+
600	Q6P799	SYSC_RAT	Sars	Serine--tRNA ligase, cytoplasmic	up	-	Cp	6	0.15	120	59064	5.86	20	
535	P85834	EFTU_RAT	Tufm	Elongation factor Tu, mitochondrial	down	-	Mito	6	2.02	295	49890	7.23	27	
Proteine Signaltransduktion														
29	P59215	GNAO_RAT	Gnao1	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha	down	-	M, hGc	4	-	167	40613	5.34	23	
45	P54313	GBB2_RAT	Gnb2	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2	down	-	M, Cp	6	4.36	161	38048	5.6	19	
480	P62994	GRB2_RAT	Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2	-	up	Nc, Cp	6	0.56	89	25736	5.57	9	
525	P63086	MK01_RAT	Mapk1	Mitogen-activated protein kinase 1	down	-	Nc, Cp	6	2.17	292	41648	6.5	26	

Anhang: Ergebnistabellen

108	F1M7Y3	F1M7Y3_RAT	Rap1gds1	RAP1, GTP-GDP dissociation stimulator 1	up	-	Cp	5	0.48	82	57128	5.48	18	
836	P35213	1433B_RAT	Ywhab	14-3-3 protein beta/alpha	up	-	Cp, Mel	6	0.45	158	28365	4.81	23	+
836	P68511	1433F_RAT	Ywhah	14-3-3 protein eta	up	-	Cp	6	0.45	158	28365	4.81	23	+
836	P63102	1433Z_RAT	Ywhaz	14-3-3 protein zeta/delta	up	-	Cp, Mel	6	0.45	158	28365	4.81	23	+
Proteine Regulation														
123	P48037	ANXA6_RAT	Anxa6	Annexin A6	down	-	Cp, Mel	6	1.89	152	76106	5.39	33	
755	P27139	CAH2_RAT	Ca2	Carbonic anhydrase 2	down	-	Cp	6	12.94	122	29267	6.89	13	
746	P45592	COF1_RAT	Cfl1	Cofilin-1	down	-	Nm, Cp	5	1.75	175	18749	8.22	15	
327	Q07266	DREB_RAT	Dbn1	Drebrin	up	-	Cp	6	0.55	222	78223	4.46	36	
575	P50399	GDIB_RAT	Gdi2	Rab GDP dissociation inhibitor beta	up	-	Cp, M	6	0.60	340	51018	5.93	38	
322	Q68FS4	AMPL_RAT	Lap3	Cytosol aminopeptidase	-	up	Cp	6	0.54	192	56514	6.77	27	
494/518	Q99MZ8	LASP1_RAT	Lasp1	LIM and SH3 domain protein 1	down	down	Cp, Csk	6	1.71	216	30350	6.61	19	
728	Q64361	LXN_RAT	Lxn	Latexin	down	-	Cp	6	1.99	71	25735	5.77	8	
742	O88767	PARK7_RAT	Park7	Protein DJ-1	down	-	Cp, Nc, Mito	6	2.24	214	20190	6.32	18	
406	P62138	PP1A_RAT	Ppp1ca	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	-	up	Cp, Nc	5	0.56	268	38229	5.94	21	
572/628	Q6AXV4	SAM50_RAT	Samm50	Sorting and assembly machinery component 50 homolog	down	down	Mom, Cp	6	2.22	246	52384	6.34	26	
31/34	P70566	TMOD2_RAT	Tmod2	Tropomodulin-2	down	down	Cp, Csk	6	3.83	135	39468	5.34	13	
581	Q5RKI0	WDR1_RAT	Wdr1	WD repeat-containing protein 1	down	-	Cp, Csk	6	2.03	305	66824	6.15	33	
Chaperone														
104/210	P18418	CALR_RAT	Calr	Calreticulin	down	down	ER	5	2.01	192	48137	4.33	17	
55	P63036	DNJA1_RAT	Dnaja1	DnaJ homolog subfamily A member 1	p7: abs	-	M, La	5	-	99	45581	6.65	9	
130	P82995	HS90A_RAT	Hsp90aa1	Heat shock protein HSP 90-alpha	-	up	Cp, Mel	5	0.34	215	83571	4.97	39	+
130	P34058	HS90B_RAT	Hsp90ab1	Heat shock protein HSP 90-beta	-	up	Cp, Mel	5	0.34	319	83571	4.97	49	+
68/568	P63018	HSP7C_RAT	Hspa8	Heat shock cognate 71 kDa protein	up	up	Cp, Mel	6	0.12	279	71055	5.37	42	
101	P63039	CH60_RAT	Hspd1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	down	-	Mmt	6	1.81	139	61088	5.91	14	

Anhang: Ergebnistabellen

420/332	Q5XHZ0	TRAP1_RAT	Trap1	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	down	down	Mito	5	1.92	115	80639	6.56	18	
Strukturproteine														
27	P60711	ACTB_RAT	Actb	Actin, cytoplasmic 1	down	-	Cp, Csk	6	2.70	62	42052	5.29	11	
199,211	Q9QXQ0	ACTN4_RAT	Actn4	Alpha-actinin-4	-	up	Nc, Cp	6	0.57	162	105306	5.27	33	+
138	Q62950	DPYL1_RAT	Crmp1	Dihydropyrimidinase-related protein 1	up	-	Cp, Csk	6	0.49	274	62499	6.64	29	
50,348/119,372,39 4,578,590	P47942	DPYL2_RAT	Dpysl2	Dihydropyrimidinase-related protein 2	-	up	Cp	6	0.44	226	62638	5.95	27	+
567,599	Q62952	DPYL3_RAT	Dpysl3	Dihydropyrimidinase-related protein 3	up	-	Cp, Gc	6	0.09	293	62327	6.04	46	+
399,418	Q9JHU0	DPYL5_RAT	Dpysl5	Dihydropyrimidinase-related protein 5	up	-	Cp	6	0.11	364	62071	6.6	44	+
321/577	P85845	FSCN1_RAT	Fscn1	Fascin	up	up	Cp, Csk	6	0.31	263	55198	6.29	29	
40,52	P47819	GFAP_RAT	Gfap	Glial fibrillary acidic protein	down	up	Cp	5	5.13	398	49984	5.35	44	
237	D4A6B2	D4A6B2_RAT	Immt	Mitochondrial inner membrane protein	down	-	Mito, Mim	5	2.17	378	83104	5.34	49	
18	P23565	AINX_RAT	Ina	Alpha-internexin	down	-	Nf	6	2.72	440	56253	5.2	45	
103	P19527	NFL_RAT	Nefl	Neurofilament light polypeptide	down	-	Nf, A	6	5.77	433	61355	4.63	52	
266	P12839	NFM_RAT	Nefm	Neurofilament medium polypeptide	down	-	Nf, Csk, A	6	2.73	326	95848	4.77	46	
537	B5DFG5	B5DFG5_RAT	Sept6	Septin-6	down	-	Cr, Cp	6	2.01	281	49147	6.23	28	
325/117	B0BNF1	SEPT8_RAT	Sept8	Septin-8	down	down	Cp, Csk	6	1.80	93	51562	5.74	13	
102,103	P68370	TBA1A_RAT	Tuba1a	Tubulin alpha-1A chain	-	up	Cp, Csk	6	0.56	204	50788	4.94	21	+
85	Q6P9V9	TBA1B_RAT	Tuba1b	Tubulin alpha-1B chain	-	up	Cp, Csk	6	0.21	200	50804	4.94	35	+
51	Q6AYZ1	TBA1C_RAT	Tuba1c	Tubulin alpha-1C chain	down	-	Cp, Csk	6	3.28	113	50590	4.96	9	
85	Q4QRB4	TBB3_RAT	Tubb3	Tubulin beta-3 chain	-	up	Cp, Csk	6	0.21	236	50842	4.82	38	+
85	B4F7C2	RCG45085	Tubb4	Tubulin, beta 4A class IVa	-	up	Cp, MT	6	0.21	231	50010	4.78	39	+
Transportproteine														
695	P85515	ACTZ_RAT	Actr1a	Alpha-centractin	up	-	Cp, Cts	6	0.52	231	42701	6.19	23	
662	P02770	ALBU_RAT	Alb	Serum albumin	up	-	Sc	6	0.16	422	70682	6.09	52	
13/28	Q5M7T6	Q5M7T6_RAT	Atp6v0d1	ATPase, H+ transporting, lysosomal 38kDa, V0 subunit d1	down	down	M	6	2.97	186	40731	4.89	17	

Anhang: Ergebnistabellen

118,119	D4A133	D4A133_RAT	Atp6v1a	ATPase, H+ transporting, lysosomal 70kDa, V1 subunit A	down	-	Mito, Cts	6	1.83	360	68564	5.42	54	+
60	P62815	VATB2_RAT	Atp6v1b2	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	down	-	M, Mel	5	4.93	334	56857	5.57	41	
43/89	P85969	SNAB_RAT	Napb	Beta-soluble NSF attachment protein	down	down	M	4	6.07	330	33791	5.32	32	
700	Q9QUL6	NSF_RAT	Nsf	Vesicle-fusing ATPase	down	-	Cp	6	2.15	77	83170	6.55	16	
431	Q9Z2L0	VDAC1_RAT	Vdac1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	down	down	Mom, M	5	2.81	215	30851	8.62	19	
767	P81155	VDAC2_RAT	Vdac2	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	down	-	Mom	5	3.22	126	32353	7.44	10	

7.6.4 Ergebnistabelle des Cerebellums mit Bezug auf die Ergebnisse der „multi condition coverage method“ und des „Mann-Whitney U“-Tests

7.6.4 Tab. A1 (d): Ergebnistabelle des Cerebellums mit Bezug auf die Ergebnisse der „multi condition coverage method“ und des „Mann-Whitney U“-Tests.

Accession	Entry name	Gene name	Funkt. Gruppe/Protein Name	zell. Lokalisation	Regulation [P7]	p-value	Regulation [P637]	p-value	Kontrolle/ PD (P90/P7,P63 7)	H	Score	Qm	MW	pI
Proteine Kohlenstoffmetabolismus														
					(SVQ ≤ 0.6)		(SVQ ≥ 1.67)						(calc.)	
P08461	ODP2_RAT	Dlat	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	Mmt	-	-	up	0.0062	0.32	5	241	28	67637	8.76
P04764	ENOA_RAT	Eno1	Alpha-enolase	Cp, M	down	0.1745	-	-	1.90	5	107	12	47440	6.16
P07323	ENOG_RAT	Eno2	Gamma-enolase	Cp, M	down	0.3367	-	-	2.22	6	272	32	47510	5.03
P04797	G3P_RAT	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Cp, Nc	down	0.0250	-	-	3.09	6	262	34	36090	8.14
P04636	MDHM_RAT	Mdh2	Malate dehydrogenase, mitochondrial	Mmt	-	-	up	0.1441	0.49	5	242	24	36117	8.93
Q5X178	ODO1_RAT	Ogdh	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	Mmt	down	0.0190	-	-	1.93	4	158	18	117419	6.3
P49432	ODPB_RAT	Pdhb	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	Mmt	down	0.0039	-	-	5.80	6	139	18	39299	6.2
D3Z955	D3Z955_RAT	Pgm2l1	Phosphoglucomutase 2-like 1	Cts	up	0.0250	-	-	0.52	6	126	17	71102	6.09
P50137	TKT_RAT	Tkt	Transketolase	Nc	down	0.0065	-	-	2.09	6	339	35	68342	7.23
Proteine Aminosäuremetabolismus														
Q6Q0N1	CNDP2_RAT	Cndp2	Cytosolic non-specific dipeptidase	Cp	-	-	up	0.0106	0.48	5	205	29	53116	5.43
Q4V7C6	GUAA_RAT	Gmps	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	Cp	up	0.0062	-	-	0.52	5	130	17	77507	6.21
P14882	PCCA_RAT	Pcca	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial	Mmt	down	0.0283	-	-	2.14	5	262	32	82198	7.59
Proteine Fettmetabolismus														
Q5X122	THIC_RAT	Acat2	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	Cp	-	-	up	0.0209	0.42	4	180	16	41538	6.86
O35263	PA1B3_RAT	Pafah1b3	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma	Cp	up	0.0062	-	-	0.27	6	135	11	25961	6.42
Q568Z9	PHYIP_RAT	Phyhip	Phytanoyl-CoA hydroxylase-interacting protein	Pers	up	0.0105	-	-	0.54	4	160	17	38101	6.53

Anhang: Ergebnistabellen

Proteine Energiemetabolismus														
P15999	ATPA_RAT	Atp5a1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Mim, M	down	0.0285	up	0.0001	3.49	5	295	38	59831	9.22
P31399	ATP5H_RAT	Atp5h	ATP synthase subunit d, mitochondrial	Mito, Mm	down	0.0039	-	-	2.70	6	148	13	18809	6.17
Q561S0	NDUAA_RAT	Ndufa10	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	Mmt	down	0.0190	-	-	3.09	4	261	21	40753	7.64
Q641Y2	NDUS2_RAT	Ndufs2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	Mim	down	0.0163	-	-	2.46	6	247	31	52927	6.52
D3ZG43	D3ZG43_RAT	Ndufs3	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) Fe-S protein 3 (Predicted), isoform CRA_c	Mito, Mm	down	0.0039	-	-	3.29	6	280	21	20190	6.32
P19234	NDUV2_RAT	Ndufv2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	Mim	down	0.0472	-	-	2.48	5	138	13	27703	6.23
Proteine Degradation														
P60901	PSA6_RAT	Pma6	Proteasome subunit alpha type-6	Cp, Nc	up	0.0039	-	-	0.48	6	173	16	27838	6.34
P40112	PSB3_RAT	Psb3	Proteasome subunit beta type-3	Cp, Nc	up	0.0176	-	-	0.27	5	124	12	23234	6.15
D4A640	D4A640_RAT	Psb4	Proteasome subunit beta type	Cp, Nc	up	0.0065	-	-	0.56	6	102	7	25858	5.97
Q9JHW0	PSB7_RAT	Psb7	Proteasome subunit beta type-7	Cp, Nc	up	0.0039	-	-	0.44	6	120	10	30250	8.13
Q4V8E2	Q4V8E2_RAT	Psm14	Proteasome (Prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 14	P, Np	up	0.0881	-	-	0.56	4	64	7	34726	6.06
Proteine Antioxidantia														
O08557	DDAH1_RAT	Ddah1	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	Mito, Cp	up	0.0176	-	-	0.44	5	283	26	31805	5.75
Q9Z1B2	GSTM5_RAT	Gstm5	Glutathione S-transferase Mu 5	Cp	down	0.0065	-	-	2.92	6	232	22	27067	6.33
Q9Z339	GSTO1_RAT	Gsto1	Glutathione S-transferase omega-1	Cp, Cts	down	0.0547	-	-	2.27	6	81	10	27936	6.25
Q9Z0V6	PRDX3_RAT	Prdx3	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	Mito	down	0.0104	-	-	1.87	6	72	8	28563	7.14
O35244	PRDX6_RAT	Prdx6	Peroxisoredoxin-6	Cp, Lyso	down	0.0039	-	-	3.75	6	207	18	24860	5.64
Proteine Biosynthese														
Q6P7P5	BZW1_RAT	Bzw1	Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1	Cp	up	0.0550	-	-	0.52	4	77	10	48184	5.75
Q4KM73	KCY_RAT	Cmpk1	UMP-CMP kinase	Nc, Cp	up	0.0163	-	-	0.55	6	149	10	22383	5.66

Anhang: Ergebnistabellen

P62630	EF1A1_RAT	Eef1a1	Elongation factor 1-alpha 1	Cp, Nc	up	0.5839	-	-	0.44	5	73	10	50424	9.1
Q68FR6	EF1G_RAT	Eef1g	Elongation factor 1-gamma	Rs, Cts	up	0.0550	-	-	0.37	6	235	27	50371	6.31
Q5RK11	IF4A2_RAT	Eif4a2	Eukaryotic initiation factor 4A-II	Cts	-	-	down	0.0090	5.16	5	196	28	46601	5.33
Q32PX7	FUBP1_RAT	Fubp1	Far upstream element-binding protein 1	Nc	down	0.0283	-	-	1.78	5	97	10	67326	7.18
Q794E4	HNRPF_RAT	Hnrnpf	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	Nc, Np	up	0.0105	-	-	0.11	4	158	21	46043	5.31
Q6AY09	HNRH2_RAT	Hnrnp2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	Nc, Np	-	-	up	0.0285	0.42	5	194	28	49547	5.89
P85973	PNPH_RAT	Pnp	Purine nucleoside phosphorylase	Cp	up	0.0550	-	-	0.59	6	263	31	32566	6.46
P62716	PP2AB_RAT	Ppp2cb	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform	Cp, Nc, Cr	-	-	down	0.0143	2.41	4	169	16	36123	5.21
P53042	PPP5_RAT	Ppp5c	Serine/threonine-protein phosphatase 5	Nc	down	0.0758	-	-	2.37	5	159	18	57507	5.84
F1LPS8	F1LPS8_RAT	Pura	Transcriptional activator protein Pur-alpha	Nc, Cp	down	0.1093	down	0.0176	1.70	6	73	12	34976	6.07
Q925G0	RBM3_RAT	Rbm3	Putative RNA-binding protein 3	Nc, Cp	down	0.0163	-	-	1.87	5	73	5	16845	6.92
Q5XIG8	STRAP_RAT	Strap	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	Cp, Nc	up	0.0163	up	0.0163	0.38	6	141	15	38717	4.99
Q4KM49	SYYC_RAT	Yars	Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic	Cp	up	0.0285	up	0.0547	0.57	5	141	18	59420	6.57
P62961	YBOX1_RAT	Ybx1	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	Cp, Nc, Cpg	up	0.0446	-	-	0.52	5	219	16	35709	9.87
Proteine Signaltransduktion														
P97697	IMPA1_RAT	Impa1	Inositol monophosphatase 1	Cp	up	0.3367	-	-	0.48	6	214	16	30834	5.17
P62260	1433E_RAT	Ywhae	14-3-3 protein epsilon	Cp, Mel	up	0.3367	-	-	0.51	6	213	34	29326	4.63
Proteine Regulation														
Q64640	ADK_RAT	Adk	Adenosine kinase	Cts, Nc	down	0.0039	-	-	4.50	6	129	13	40450	5.72
Q02589	ADPRH_RAT	Adprh	[Protein ADP-ribosylarginine] hydrolase	Cp	up	0.0176	-	-	0.31	5	111	12	40220	5.62
Q07936	ANXA2_RAT	Anxa2	Annexin A2	M, Mel	up	0.0782	-	-	0.53	6	71	12	38939	7.55
P27139	CAH2_RAT	Ca2	Carbonic anhydrase 2	Cp	down	0.0104	-	-	5.01	6	89	11	29267	6.89
P45592	COF1_RAT	Cfl1	Cofilin-1	Nm, Cp	up	0.1745	-	-	0.56	5	154	16	18749	8.22
P08082	CLCB_RAT	Cltb	Clathrin light chain B	Cpv, M	down	0.0209	down	0.0209	2.31	4	104	8	25216	4.56
B0BNE5	ESTD_RAT	Esd	S-formylglutathione hydrolase	Cp, Cpv	down	0.1003	-	-	1.86	5	181	15	31971	6.44

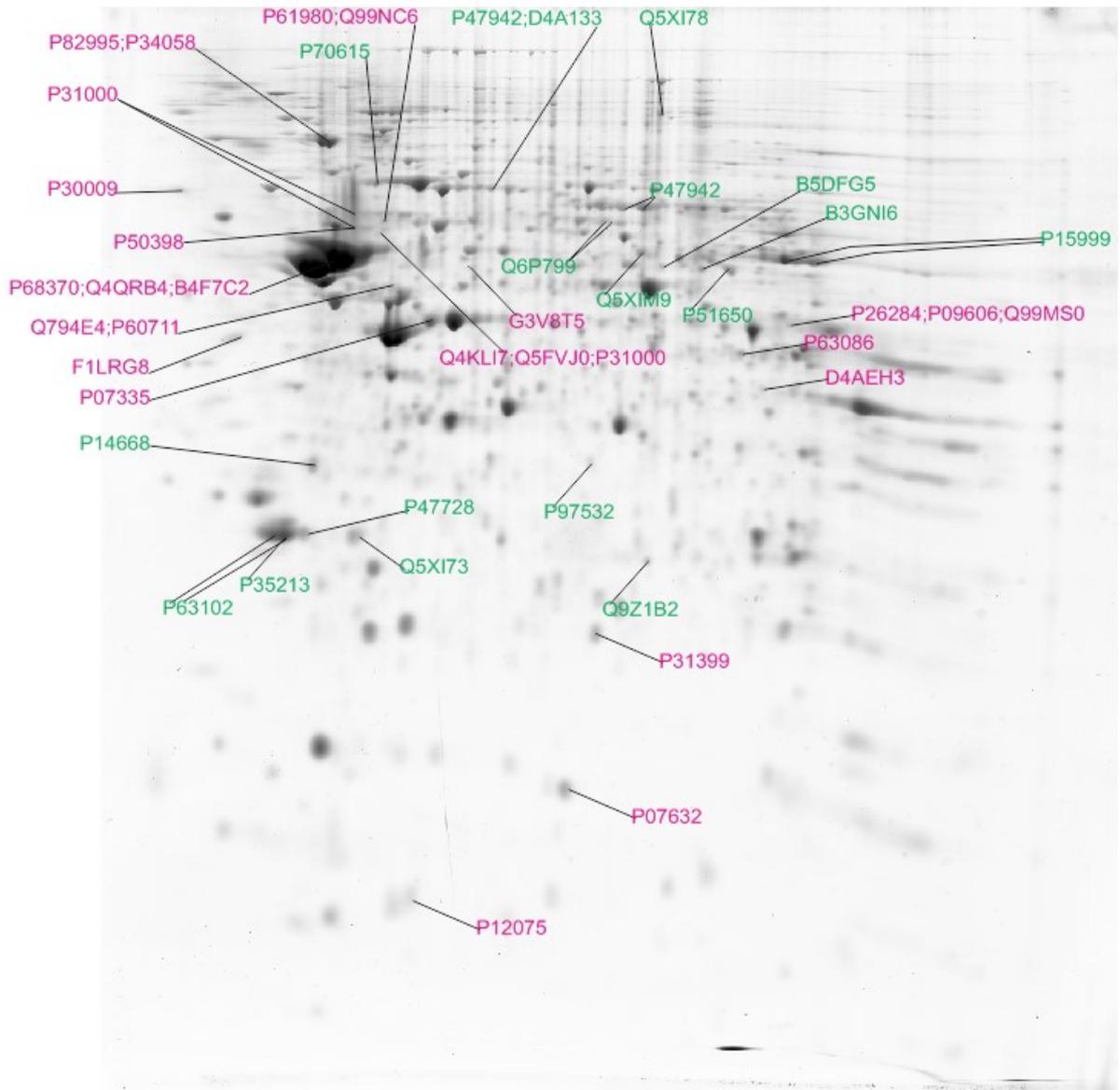
Anhang: Ergebnistabellen

P07936	NEUM_RAT	Gap43	Neuromodulin	M	up	0.0039	-	-	0.11	6	95	7	23703	4.61
P50399	GDIB_RAT	Gdi2	Rab GDP dissociation inhibitor beta	Cp, M	up	0.1093	-	-	0.52	6	311	38	51018	5.93
Q63228	GMFB_RAT	Gmfb	Glia maturation factor beta	Cp	up	0.0039	-	-	0.13	6	78	6	16897	5.32
P62749	HPCL1_RAT	Hpcal1	Hippocalcin-like protein 1	Pem	down	0.0374	-	-	1.96	6	202	17	22438	5.32
O88767	PARK7_RAT	Park7	Protein DJ-1	Cp, Nc, Mito	down	0.1093	-	-	1.74	6	280	21	20190	6.32
Q1RP74	Q1RP74_RAT	Tbcb	Tubulin folding cofactor B	Nc, Cp, MT	up	0.0176	-	-	0.32	5	196	17	27515	4.93
P70566	TMOD2_RAT	Tmod2	Tropomodulin-2	Cp, Csk	down	0.0250	-	-	3.39	6	185	15	39468	5.34
P63029	TCTP_RAT	Tpt1	Translationally-controlled tumor protein	Cp	up	0.0106	-	-	0.29	5	135	10	19564	4.76
P11232	THIO_RAT	Txn	Thioredoxin	Nc, Cp, Sc	up	0.0039	-	-	0.24	6	67	4	12008	4.8
Q920J4	TXNL1_RAT	Txn11	Thioredoxin-like protein 1	Cp	up	0.0105	-	-	0.19	4	257	19	32628	4.84
Chaperone														
Q6P502	TCPG_RAT	Cct3	T-complex protein 1 subunit gamma	Cp	-	-	up	0.0062	0.33	5	210	31	61179	6.23
Q68FQ0	TCPE_RAT	Cct5	T-complex protein 1 subunit epsilon	Cp, Cts	up	0.0176	up	0.0330	0.31	5	329	43	59955	5.51
P34058	HS90B_RAT	Hsp90ab1	Heat shock protein HSP 90-beta	Cp, Mel	down	0.2733	down	0.0104	2.39	6	260	42	83571	4.97
P06761	GRP78_RAT	Hspa5	Heat shock 70kDa protein 5	ER, Mel	down	0.8728	down	0.0105	3.49	6	315	34	72474	5.07
P11598	PDIA3_RAT	Pdia3	Protein disulfide-isomerase A3	ER, Mel	down	1.0000	down	0.9168	1.79	5	73	8	57044	5.88
Strukturproteine														
B2RYJ7	B2RYJ7_RAT	Actr1b	ARP1 actin-related protein 1 homolog B (Yeast)	Cp, Csk	down	0.0782	-	-	1.77	6	173	18	42369	5.98
Q4V7C7	ARP3_RAT	Actr3	Actin-related protein 3	Cp, Csk	up	0.0163	-	-	0.52	6	230	27	47783	5.61
B2GUZ5	CAZA1_RAT	Capza1	F-actin-capping protein subunit alpha-1	Cp, Csk	up	0.0250	-	-	0.57	6	230	19	33060	5.43
Q5XI32	CAPZB_RAT	Capzb	F-actin-capping protein subunit beta	Cp, Csk	up	0.0163	-	-	0.57	6	184	20	30952	5.69
P47819	GFAP_RAT	Gfap	Glial fibrillary acidic protein	Cp	down	0.0039	-	-	5.72	6	381	48	49984	5.35
D4A6B2	D4A6B2_RAT	Immt	Mitochondrial inner membrane protein	Mito, Mim	down	0.0547	-	-	2.58	6	375	46	83104	5.34
P23565	AINX_RAT	Ina	Alpha-internexin	Nf	down	0.0547	-	-	1.92	6	391	45	56253	5.2
P30009	MARCS_RAT	Marcks	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	Cp, M, La	up	0.0065	-	-	0.40	6	109	9	29834	4.32

Anhang: Ergebnistabellen

P19527	NFL_RAT	Nefl	Neurofilament light polypeptide	Nf, A	down	0.0039	-	-	3.49	6	412	53	61355	4.63
P12839	NFM_RAT	Nefm	Neurofilament medium polypeptide	Nf, Csk, A	down	0.0090	-	-	2.84	5	291	48	95848	4.77
B3GNI6	SEP11_RAT	Sept11	Septin-11	Cp, A	down	0.0163	down	0.2505	1.87	5	69	11	50005	6.24
P13668	STMN1_RAT	Stmn1	Stathmin	Cp, Csk	up	0.3367	-	-	0.04	6	171	14	17278	5.76
Q6AYZ1	TBA1C_RAT	Tuba1c	Tubulin alpha-1C chain	Cp, Csk	down	0.0190	-	-	3.73	4	87	8	50590	4.96
Q3KRE8	TBB2B_RAT	Tubb2b	Tubulin beta-2B chain	Cp, Csk	up	0.3472	-	-	0.48	5	317	42	50377	4.78
Transportproteine														
Q5M7T6	Q5M7T6_RAT	Atp6v0d1	ATPase, H+ transporting, lysosomal 38kDa, V0 subunit d1	M	up	0.0039	-	-	0.23	5	111	11	40731	4.89
Q811Q2	CLIC6_RAT	Clic6	Chloride intracellular channel protein 6	Cp, M	down	0.0039	down	0.0190	2.43	6	204	19	64990	4.29
Q6AYH5	DCTN2_RAT	Dctn2	Dynactin subunit 2	Cp, M	up	0.0833	-	-	0.49	4	218	21	44235	5.14
Q62871	DC112_RAT	Dync112	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	Cp, Csk	down	0.1003	down	0.0678	2.13	5	111	11	71533	5.11
P55051	FABP7_RAT	Fabp7	Fatty acid-binding protein, brain	Cp	up	0.0039	-	-	0.21	6	152	12	15140	5.46
Q9Z2L0	VDAC1_RAT	Vdac1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	Mom, M	down	0.0500	down	0.5224	2.44	4	215	17	30851	8.62
P81155	VDAC2_RAT	Vdac2	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	Mom	down	0.0039	-	-	2.25	6	168	15	32353	7.44

Abb. A1 (b): Differentielle Expression von Proteinen zum Zeitpunkt P637 im Vergleich zum Zeitpunkt P90 innerhalb des Referenz-Gels des oB.



7.7.2 Innerhalb des Referenz-Gels des Cerebellums

7.7.2 Abbildung A2 (a, b, c, d): Kennzeichnung der jeweiligen "Accession" Nummer (Swiss Prot) der differentiell regulierten Proteine innerhalb des Referenz-Gels des Ce (P90, Referenz-Gel: 68022). Proteinmixe und die Kennzeichnung eines einzelnen Proteinspot innerhalb mehrerer Spots können anhand der sich abzweigenden Linien hergeleitet werden. (a): Differentielle Expression von Proteinen zum Zeitpunkt P7 im Vergleich zum Zeitpunkt P90 (schwarz: hochregulierte Proteine); (b): Differentielle Expression von Proteinen zum Zeitpunkt P90 im Vergleich zum Zeitpunkt P7 (grün: hochregulierte Proteine); (c): Differentielle Expression von Proteinen zum Zeitpunkt P637 im Vergleich zum Zeitpunkt P90 (pink: hochregulierte Proteine); (d): Differentielle Expression von Proteinen zum Zeitpunkt P90 im Vergleich zum Zeitpunkt P637 (grün: hochregulierte Proteine).

Abb. A2 (a): Differentielle Expression von Proteinen zum Zeitpunkt P7 im Vergleich zum Zeitpunkt P90 innerhalb des Referenz-Gels des Ce.

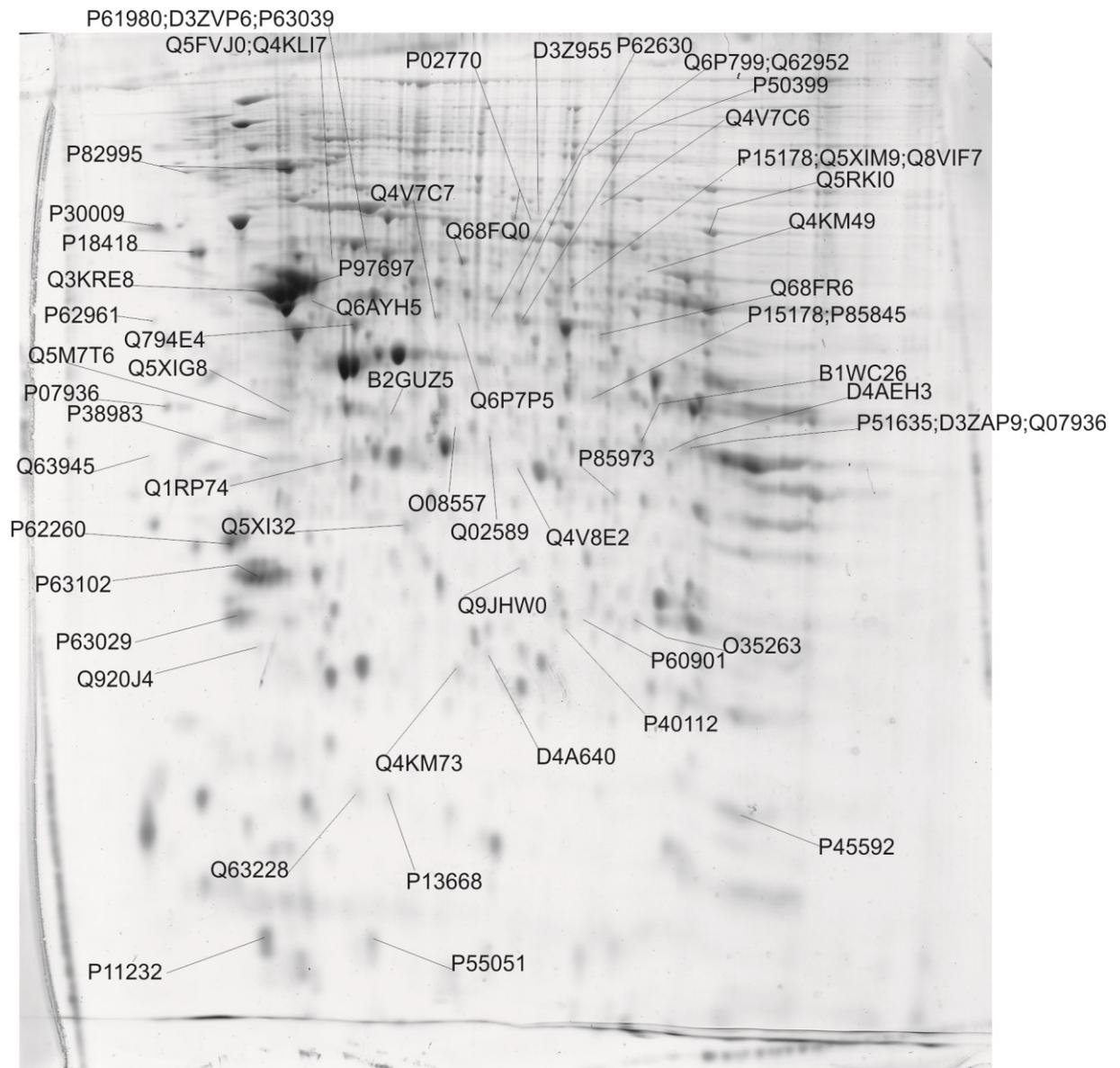


Abb. A2 (b): Differentielle Expression von Proteinen zum Zeitpunkt P90 im Vergleich zum Zeitpunkt P7 innerhalb des Referenz-Gels des Ce.

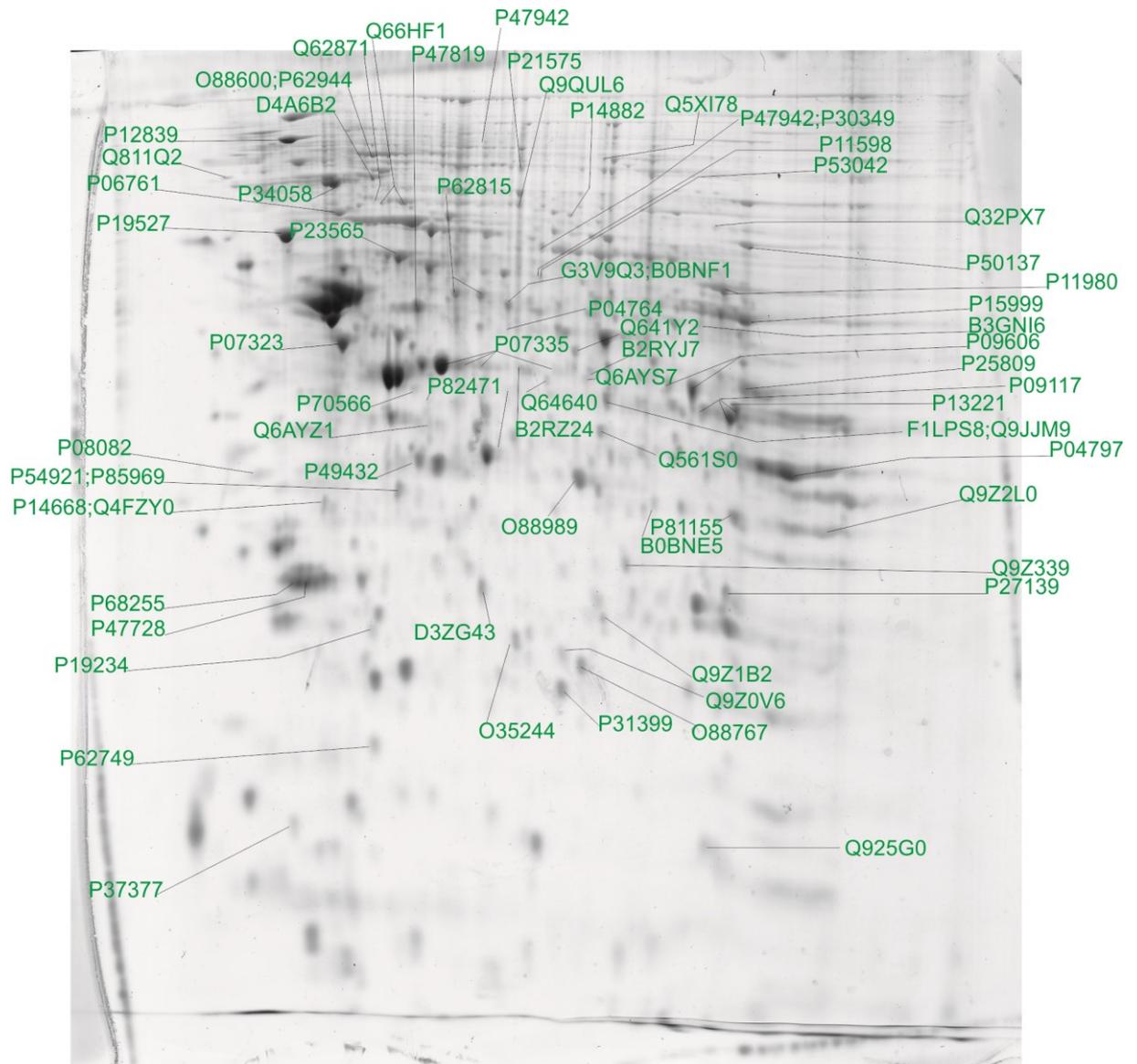


Abb. A2 (c): Differentielle Expression von Proteinen zum Zeitpunkt P637 im Vergleich zum Zeitpunkt P90 innerhalb des Referenz-Gels des Ce.

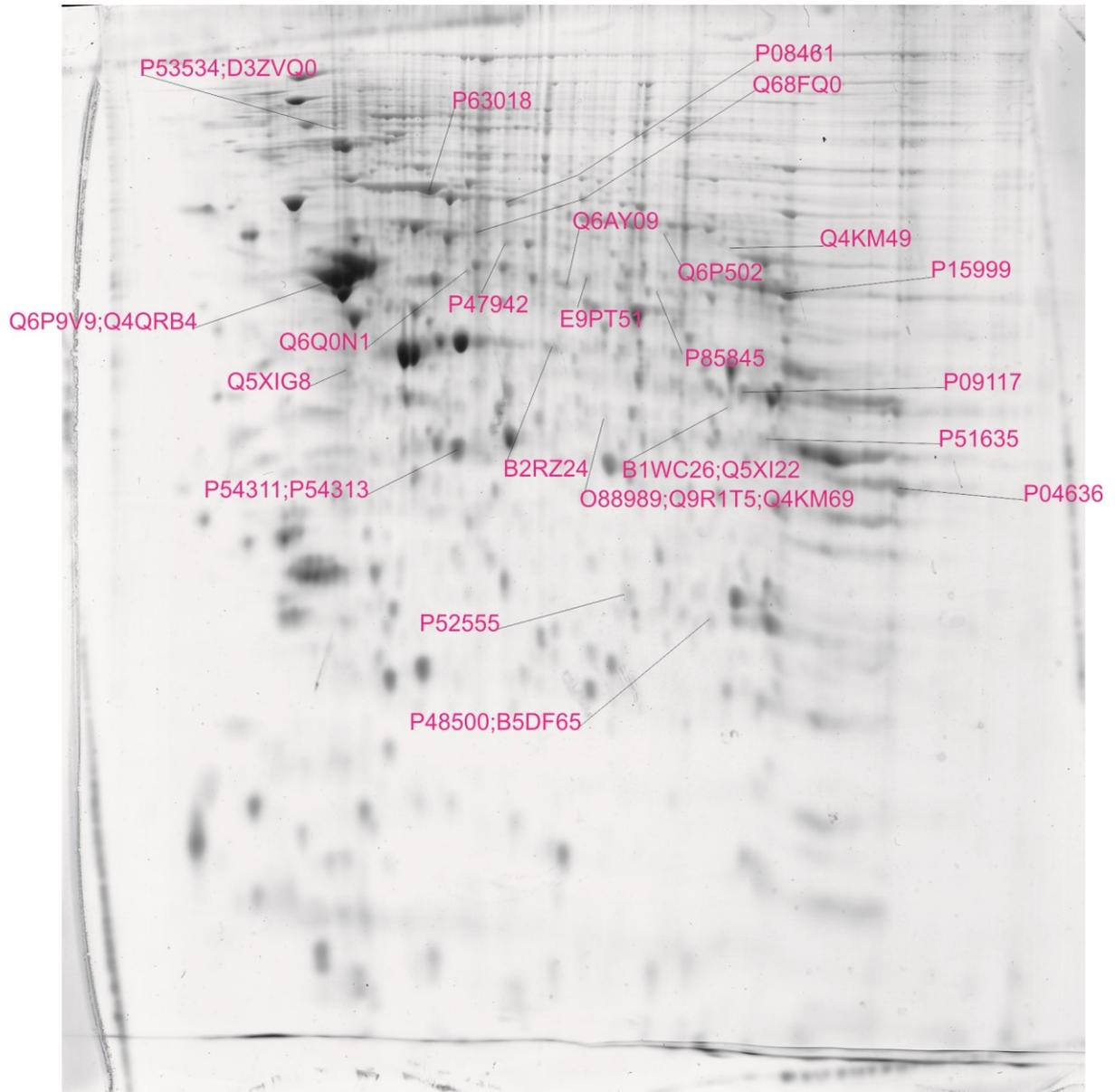
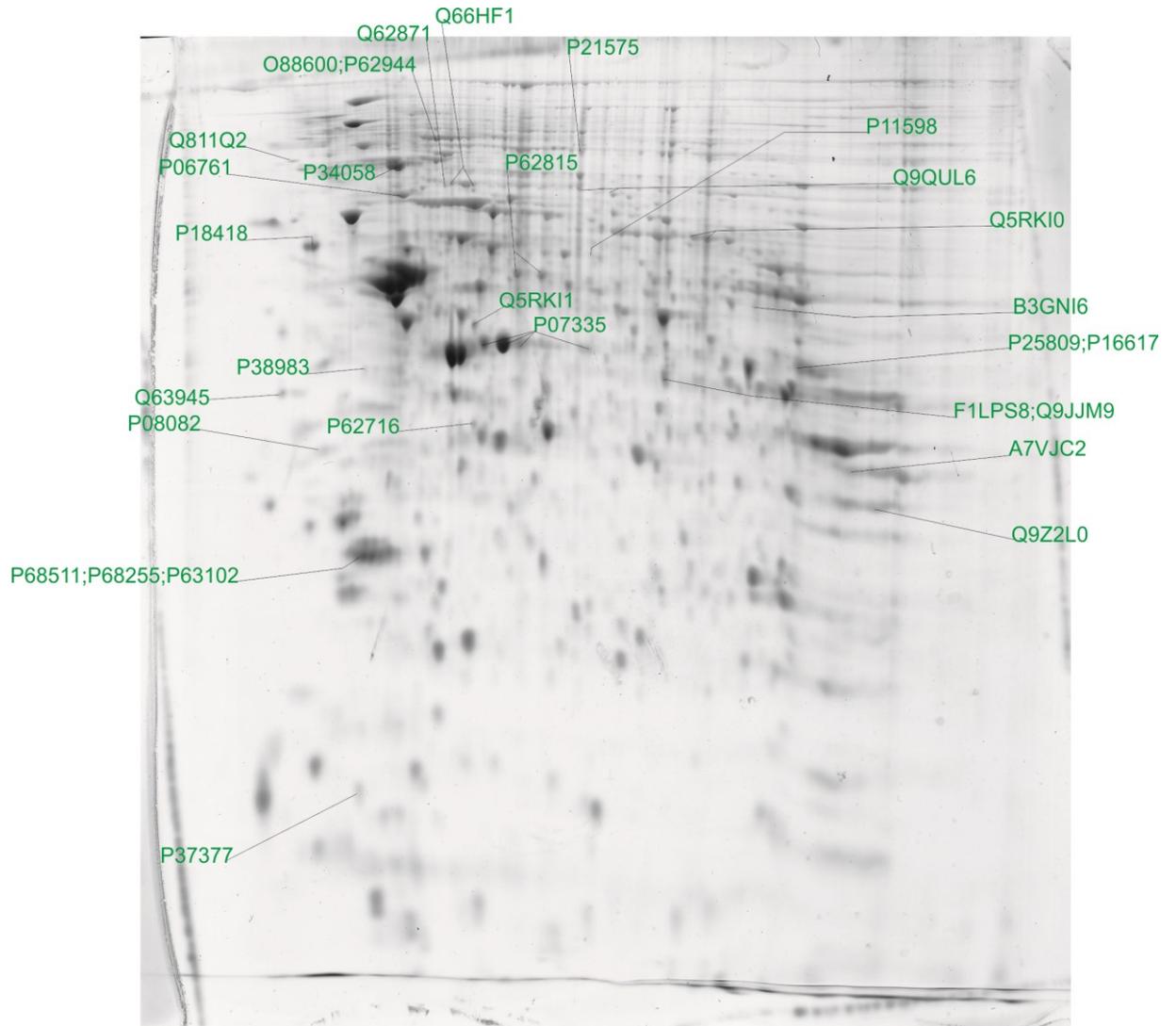


Abb. A2 (d): Differentielle Expression von Proteinen zum Zeitpunkt P90 im Vergleich zum Zeitpunkt P637 innerhalb des Referenz-Gels des Ce.



7.7.3 Innerhalb des Referenz-Gels des Cortex cerebri

7.7.3 Abbildung A3 (a, b, c, d): Kennzeichnung der jeweiligen "Accession" Nummer (Swiss Prot) der differentiell regulierten Proteine innerhalb des Referenz-Gels des Co (P90, Referenz-Gel: 61064). Proteinmixe und die Kennzeichnung eines einzelnen Proteines innerhalb mehrerer Spots können anhand der sich abzweigenden Linien hergeleitet werden. (a): Differentielle Expression von Proteinen zum Zeitpunkt P7 im Vergleich zum Zeitpunkt P90 (schwarz: hochregulierte Proteine); (b): Differentielle Expression von Proteinen zum Zeitpunkt P90 im Vergleich zum Zeitpunkt P7 (grün: hochregulierte Proteine); (c): Differentielle Expression von Proteinen zum Zeitpunkt P637 im Vergleich zum Zeitpunkt P90 (pink: hochregulierte Proteine); (d): Differentielle Expression von Proteinen zum Zeitpunkt P90 im Vergleich zum Zeitpunkt P637 (grün: hochregulierte Proteine).

Abb. A3 (a): Differentielle Expression von Proteinen zum Zeitpunkt P7 im Vergleich zum Zeitpunkt P90 innerhalb des Referenz-Gels des Co.

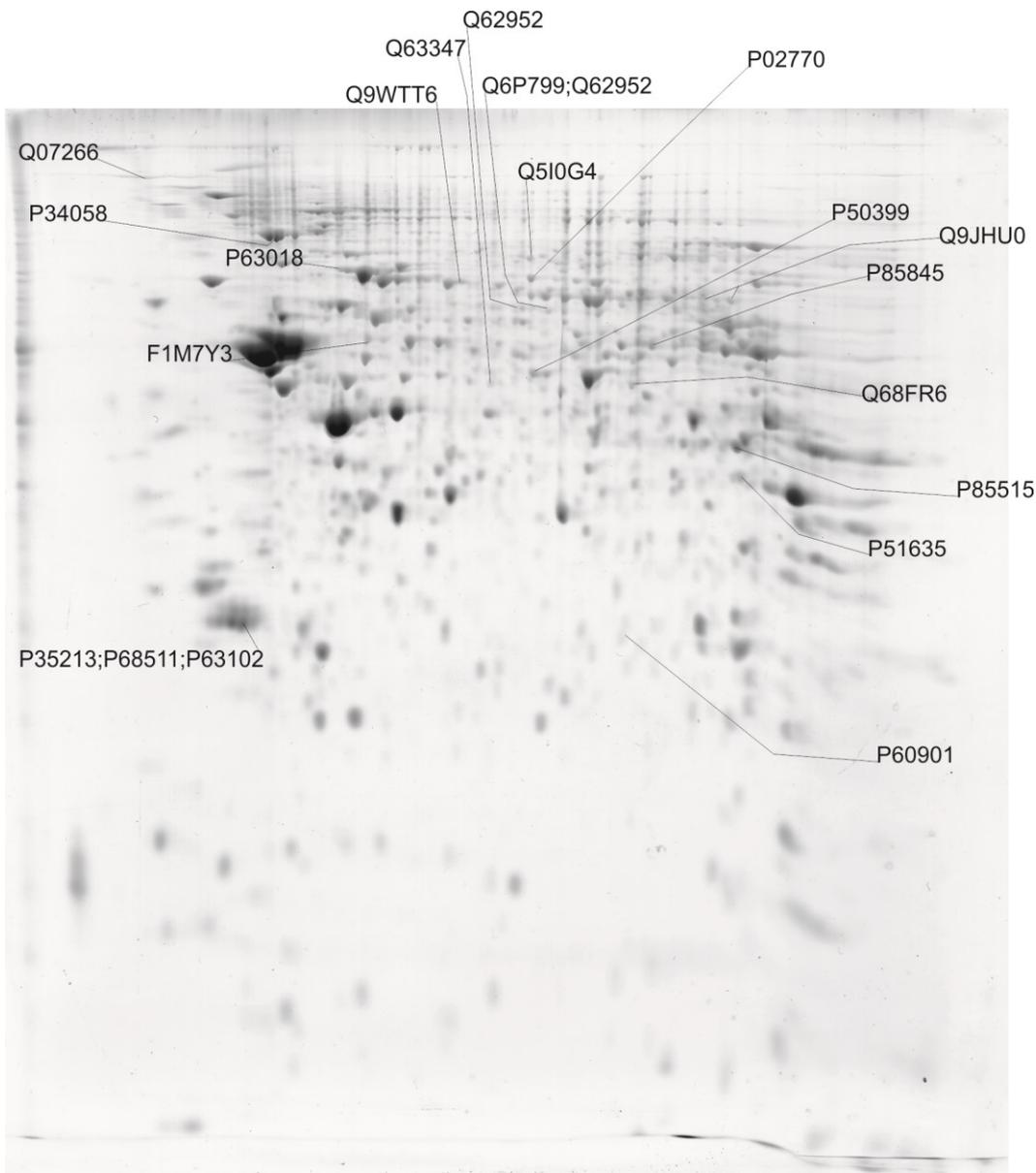


Abb. A3 (b): Differentielle Expression von Proteinen zum Zeitpunkt P90 im Vergleich zum Zeitpunkt P7 innerhalb des Referenz-Gels des Co.

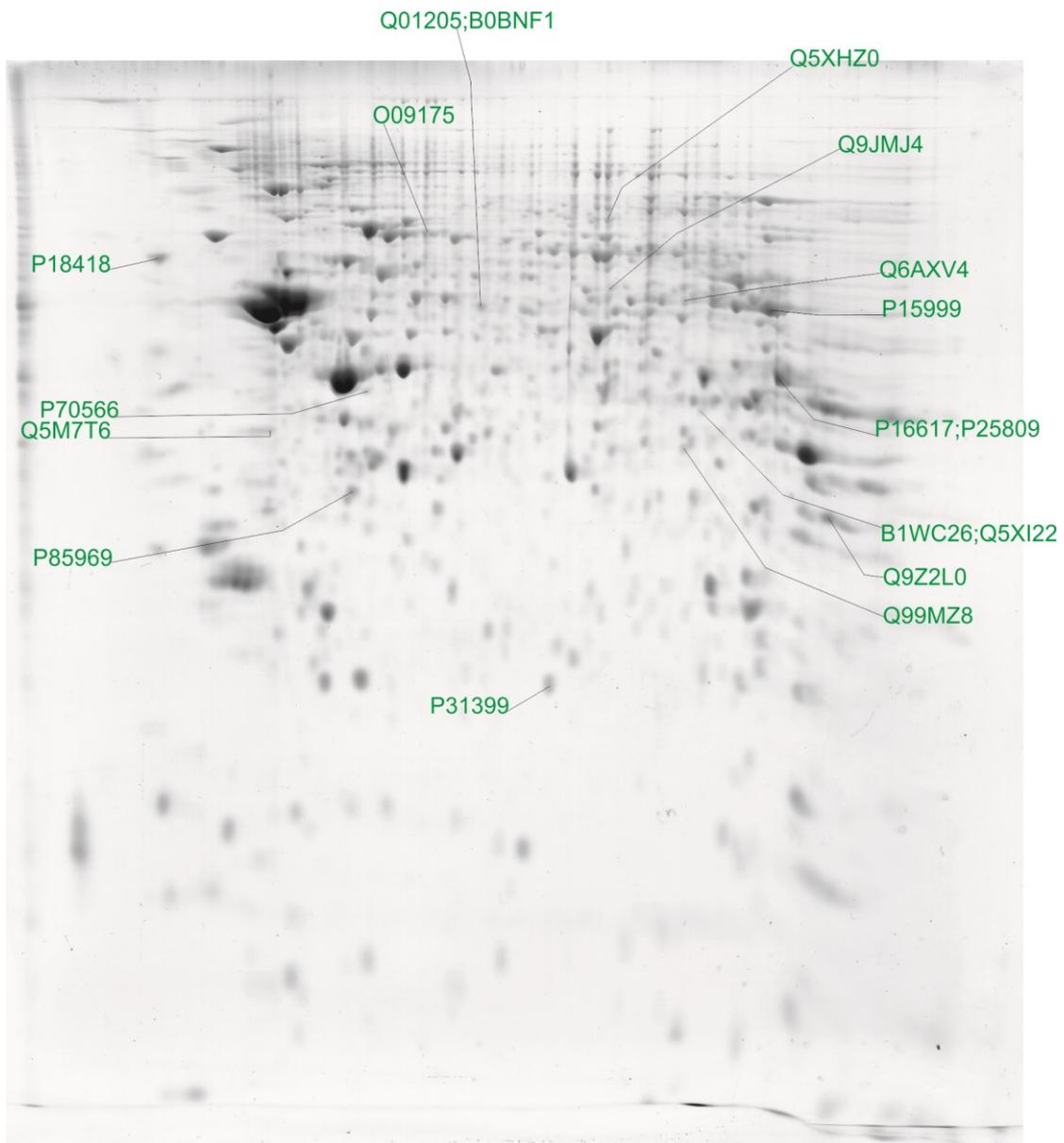


Abb. A3 (c): Differentielle Expression von Proteinen zum Zeitpunkt P637 im Vergleich zum Zeitpunkt P90 innerhalb des Referenz-Gels des Co.

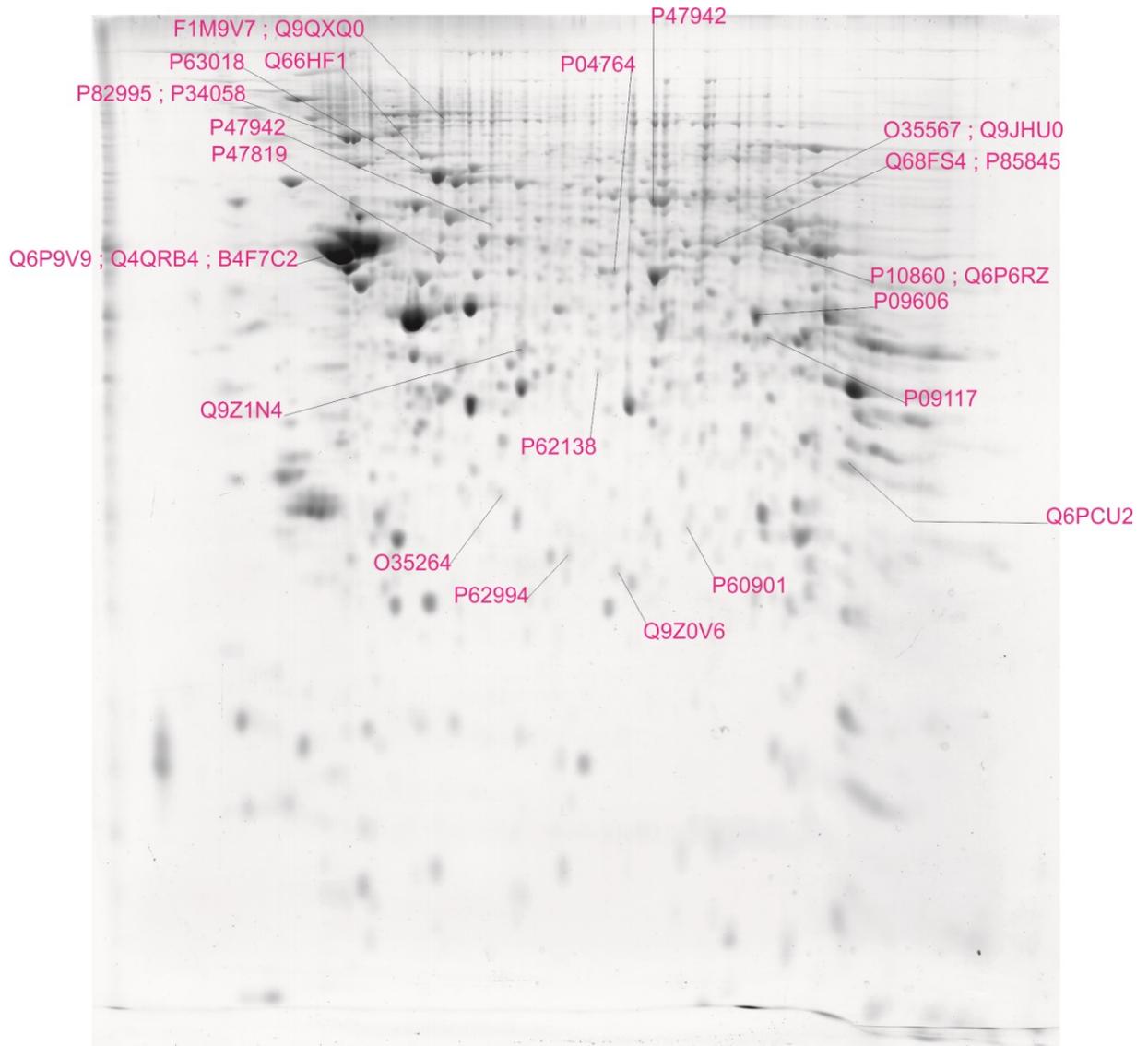
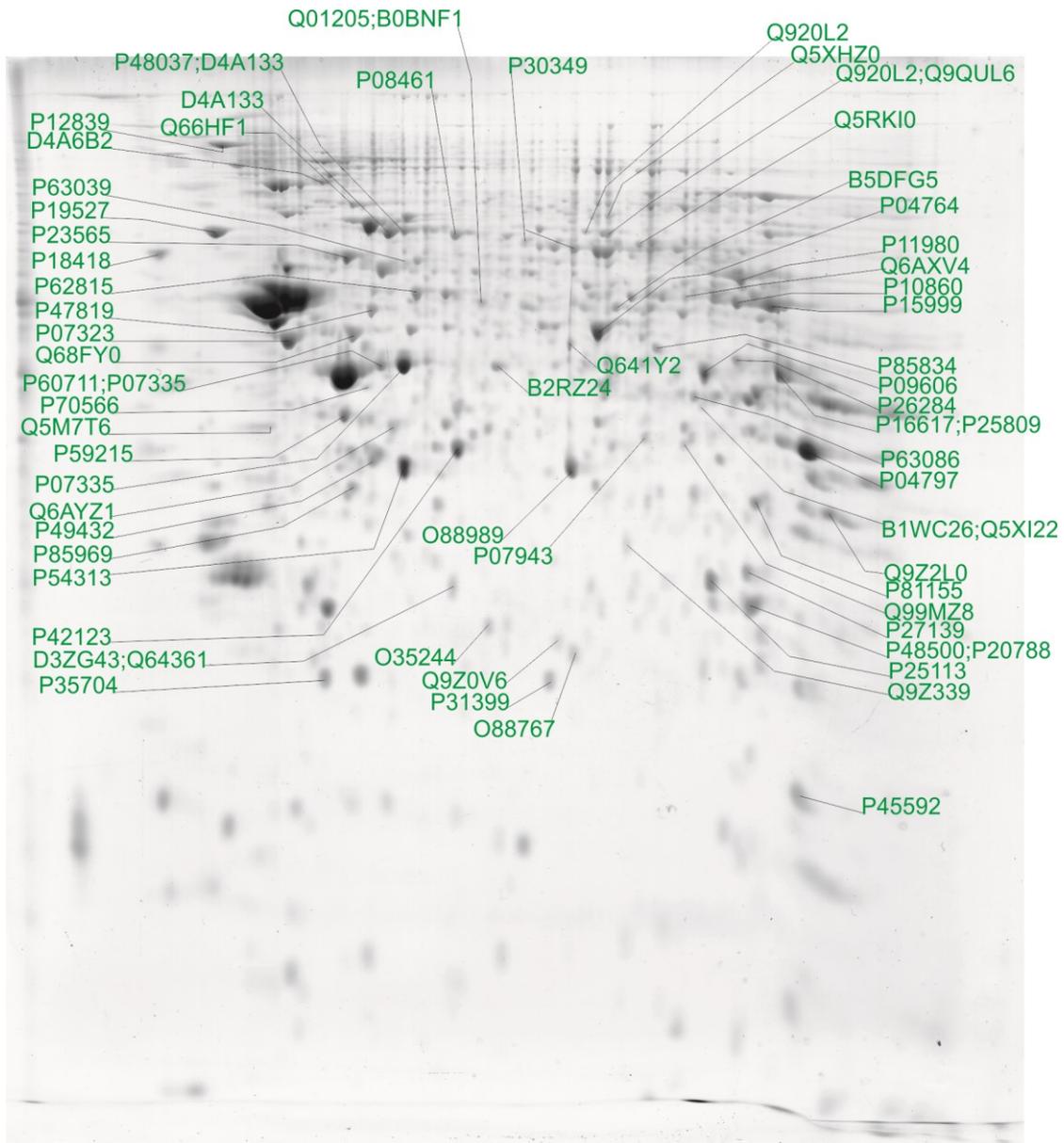


Abb. A3 (d): Differentielle Expression von Proteinen zum Zeitpunkt P90 im Vergleich zum Zeitpunkt P637 innerhalb des Referenz-Gels des Co.



Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, einen Einblick in die Entwicklung des Rattengehirns mit dem Fokus auf Expressionsunterschiede von Proteinen innerhalb des Bulbus olfactorius, des Cerebellums und des Cortex cerebri der juvenilen, adulten und gealterten Ratte zu den Zeitpunkten (P7, P90, P637) mittels 2D-Gelelektrophorese und anschließender massenspektrometrischer Identifikation zu erhalten.

Durch die Auswertung der Expressionsmuster innerhalb dieser Gebiete zu den unterschiedlichen Zeitpunkten soll eine Bestimmung von Proteinen vorgenommen werden, die einen Einfluss auf das Überleben und die Differenzierung von transplantierten Progenitorzellen in neonatale und adulte Caudatus-Putamen Komplexe haben könnten. Speziell die Bestimmung von Proteinen und Faktoren für die neuronale Differenzierung ist hierbei von Relevanz, da diese die Integration von neuronalen Stammzellen in das neonatale Gewebe beeinflussen können.

Im ersten Teil der Resultate dieser Arbeit (Kapitel 3.2-3.3) wird auf die Ergebnisse des differentiellen Proteoms sowie auf die Unterschiede in den Spotzahlen und der Proteinverteilung pro Region und Zeitpunkt eingegangen. Im nächsten Abschnitt (Kapitel 3.4) wird Bezug auf die differentielle Expression der erstellten Proteingruppen innerhalb einer Altersstufe (P7, P637) im Vergleich zu der Altersstufe (P90) für die analysierten Gehirnregionen genommen und diese werden beschrieben. Die spezifischen differentiell exprimierten Proteine werden dabei in den Tabellen (Tab. 7, 9, 11) genauer bezeichnet. In Kapitel 4 erfolgt eine Diskussion der in dieser Arbeit analysierten Befunde in Bezug auf die Neurogenese, wobei ein Vergleich mit der Literatur vorgenommen wird und differentielle Proteine funktionell eingeordnet werden.

Es ließ sich anhand der Identifikation von einzelnen Proteinen wie auch durch die Verteilung der Proteingruppen als Ganzes feststellen, dass ein Wechsel in der Zusammensetzung des Proteoms innerhalb der frühen Entwicklung, wie auch im hohen Alter der Ratte stattfindet. Zudem konnte eine Reihe von Proteinen bestimmt werden, die im neonatalen Rattengehirn Differenzierungs-, Migrations- und Proliferationsvorgänge ermöglichen und regulieren. Des Weiteren konnten auch zum Zeitpunkt P637 Proteine gefunden werden, die eine Aufrechterhaltung des neuronalen Netzwerks ermöglichen.

Beispiele hierfür sind Vertreter des Kohlenhydratmetabolismus (*Gamma-Enolase* (Eno2), *Fructose-bisphosphate aldolase C* (Aldoc)) und Proteine des Energiemetabolismus (Vertreter der NADH Dehydrogenase-Familie), die eine wichtige Rolle bei der Etablierung der Neurogenese spielen. Auch Proteine mit regulatorischer Funktion (z.B. *Neuromodulin* (Gap43)), Strukturproteine (*Dihydropyrimidinase-related Proteine* (Dpysl3, Dpysl5, Crmp1), *Stathmin* (Stmn1), *Drebrin* (Dbn1) und Neurofilamente (Nefm, Nefl)) sowie Transportproteine (Untereinheiten des Dynactin/Dynein Aktivator Komplexes (Alpha-centractin (Actr1a), Dynactin subunit 2 (Dctn2), Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2 (Dync1i2), *Vesicle-fusing ATPase* (Nsf)) sind direkt in die Architektur des Zytoskeletts involviert und somit entscheidend für die Axo-, Dendrito- und Synaptogenese. Deshalb können die in dieser Arbeit erhaltenen Kenntnisse für weitere experimentelle Untersuchungen genutzt werden, um so eine eventuelle Rolle der hier ermittelten Proteinkandidaten in der Transplantation von neuronalen Progenitorzellen zu überprüfen.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Oliver Schmitt für die Überlassung des interessanten Themas, für die intensive Betreuung und Unterstützung, und für die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Anatomie durchführen zu können.

Dem Team des Proteomzentrums, Prof. Dr. Michael Glocker, Dr. Stefan Mikkat und Michael Kreutzer, danke ich für die Unterstützung bei der massenspektrometrischen Analyse der Gele.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Andreas Wree für das Vertrauen und seine stetige Hilfsbereitschaft.

Für die Unterstützung bei den aufwendigen Laborarbeiten, deren Optimierung sowie für die entspannte Laboratmosphäre danke ich der BTA Frau Antje Schümann sowie der MTA Frau Jana Weiß-Müller herzlich.

Für so manchen wertvollen Hinweis sei auch Herrn PD Dr. rer. nat. Andressen ganz herzlich gedankt.

Bei allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Anatomie der Universität Rostock bedanke ich mich für die freundliche und zuvorkommende Unterstützung im Alltag.